

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAS

LETÍCIA MARIÊ MINATOGAU FERRO

**FABRICAÇÃO DE BIOSSENSOR ÓPTICO DE GLICOSE EM ALUMINA ANÓDICA
POROSA**

Sorocaba
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

LETÍCIA MARIÊ MINATOGAU FERRO

**FABRICAÇÃO DE BIOSSENSOR ÓPTICO DE GLICOSE EM ALUMINA ANÓDICA
POROSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, para obtenção do título de mestre.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino

Coorientação: Prof.^a Dr.^a Marystela Ferreira

Sorocaba
2016

Ferro, Leticia Mariê Minatogau

Fabricação de Biossensor Óptico de Glicose em Alumina Anódica Porosa /
Leticia Mariê Minatogau Ferro. -- 2016.
78 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Francisco Trivinho Strixino

Banca examinadora: Adriana de Oliveira Delgado Silva, Antonio Riul
Júnior

Bibliografia

1. Alumina Anódica Porosa . 2. Biossensor. 3. Quimiometria. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA MARIÊ MINATOGAU FERRO

**“FABRICAÇÃO DE BIOSSENSOR ÓPTICO DE GLICOSE
EM ALUMINA ANÓDICA POROSA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 31 de março de 2016.

Orientador(a)



Prof (a). Dr.(a) Francisco Trivinho Strixino
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr. (a) Adriana de Oliveira Delgado Silva
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Antonio Riu Jr.
UNICAMP – Universidade de Campinas / IFGW – Instituto de Física Gleb Wataghins



Dedico este trabalho, bem como tudo o que dele provir, aos meus pais, Ernesto e Ivone, e aos meus irmãos, Rafael e Verônica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino, pela orientação, apoio e ensinamentos dedicados a mim de forma muito atenciosa e paciente. Agradeço também pela amizade, incentivo, confiança e pelas oportunidades de amadurecimentos profissional e pessoal.

À Prof.^a Dr.^a Marystela Ferreira, pela coorientação, pelo conhecimento compartilhado e por disponibilizar seus equipamentos para o melhor desenvolvimento deste projeto. Agradeço também a sua discente, Juliana Graça, pela ajuda inicial no trabalho.

Ao Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos (departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba), pela atenção e cuidado no tratamento dos dados através da quimiometria e na explicação dos métodos utilizados e dos resultados obtidos.

Aos integrantes do grupo de pesquisa de superfícies e materiais nanoestruturados (GPSM nano), em especial à Lory Cantelli, por toda ajuda, conselhos e discussões pertinentes ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza (departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos), por disponibilizar a célula de vidro utilizada nos testes dos sensores.

Ao técnico Rorivaldo de Camargo do Centro Multidisciplinar para o Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC – LIEC) pela obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Dr.^a Celina Massumi Miyazaki e ao Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini, pelos conselhos dados no exame de qualificação que foram importantes para a continuidade do trabalho.

Ao Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman, pelos conselhos, conversas, atenção e risadas.

A todos os professores que passaram em minha vida, pois, neste trabalho, há uma fração de cada um deles que contribuíram com minha formação profissional.

À CAPES, pela bolsa concedida.

De maneira geral, agradeço aos meus familiares e amigos, por todo apoio, companheirismo e compreensão na minha ausência devido aos estudos.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

(Fernando Teixeira de Andrade)

RESUMO

A alumina anódica porosa (AAP) vem sendo utilizada como plataforma na fabricação de sensores ópticos por apresentar resistência química, estabilidade térmica, dureza, biocompatibilidade, grande área superficial que facilita a interação com o analito e boa organização morfológica com a possibilidade de se manipular as dimensões de seus poros. Além disso, a AAP apresenta respostas ópticas caracterizadas pelas interferências de Fabry-Pérot, que podem ser obtidas por espectroscopia de fotoluminescência e de reflectância. A superfície da AAP ainda pode ser modificada pela técnica de deposição por camadas, *Layer-by-Layer* (LbL), com o intuito de se aprimorar esses sensores ópticos, sendo que mudanças nas interferências de Fabry-Pérot podem ser acompanhadas e analisadas como resposta do sensor. Neste trabalho, houve a deposição de filmes LbL de polialilamina hidroclorada (PAH) e de glicose oxidase (GOx), contendo um colchão de PAH e de ácido poli(vinil sulfônico) (PVS), com a finalidade de fabricação de um biossensor óptico de glicose. O crescimento dos filmes foi acompanhado por fotoluminescência e reflectância total. Além disso, testes dos biossensores foram realizados imergindo a AAP em soluções de glicose com concentrações diferentes a fim de se verificar alterações nas oscilações apresentadas nos espectros. A partir dos resultados obtidos foram verificados o crescimento ordenado do filme LbL e a resposta do biossensor, que foi caracterizada pelo deslocamento das interferências de Fabry-Pérot para comprimentos de onda menores e por análise multivariada. O limite de detecção determinado através da análise qualitativa das oscilações de Fabry-Pérot foi de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose, tanto para a AAP sem modificação superficial, quanto para a modificada. Com o emprego da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês “partial least squares”) foi possível a determinação de glicose a partir de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para a AAP sem modificação e de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ para a AAP com filme LbL. Além disso, foi verificada também a viabilidade de se utilizar a quimiometria para analisar as interferências de Fabry-Pérot obtidas com a AAP como um método alternativo do apresentado na literatura, que envolve conceitos da equação de Fabry-Pérot.

Palavras-chave: Alumina anódica porosa. Biossensor. Quimiometria.

ABSTRACT

Porous anodic alumina (PAA) has been used as platform for the manufacture of optical sensors. It shows chemical resistance, thermal stability, hardness, biocompatibility, high surface area which facilitates interaction with the analyte and good morphological organization with the possibility to manipulate its pore size. Furthermore, PAA shows optical responses characterized by Fabry-Pérot interferences that can be obtained by photoluminescence and reflectance spectroscopy. Besides the surface of the AAP can be modified by Layer-by-Layer technique (LbL) in order to enhance optical sensors. Changes in Fabry-Pérot interferences can be monitored and analyzed as sensor responses. In this work, LbL film were deposited using hydrochloride polyallylamine (PAH) and glucose oxidase (GOx) for the purpose of manufacturing an optical biosensor for glucose detection. A protective bilayer of PAH and poly(vinyl sulfonic acid) (PVS) was assembled. The growth of the films were monitored by photoluminescence and total reflectance techniques. In addition, biosensor tests were carried out by immersing PAA in glucose solutions with different concentrations in order to check for changes in Fabry-Pérot oscillations. Analyzing the results, orderly growth of LbL film and biosensor response were verified. Results of the biosensor test were characterized by displacements of Fabry-Pérot interferences to shorter wavelengths and by multivariate analysis. Limit of detection determined by qualitative analysis of the Fabry-Pérot oscillations was 0.1 mol.L^{-1} to both PAA without surface modification and modified PAA. By using partial least squares (PLS) regression, it was possible to determine glucose from 0.1 mol.L^{-1} with PAA without modification and 0.01 mol.L^{-1} for PAA with LbL film. Furthermore, it was also verified the viability of using chemometrics to examine Fabry-Pérot interferences obtained with the PAA as an alternative method shown in the literature, which involves concepts of Fabry-Pérot equation.

Keywords: Porous anodic alumina. Biosensor. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Óxidos dos tipos (A) barreira e (B) poroso obtidos através da anodização de alumínio.	14
Figura 2: Esquema de crescimento dos poros durante anodização.	15
Figura 3: Duas regiões quimicamente distintas que compõem o poro.	15
Figura 4: Curva de anodização potenciostática dividida em quatro processos que ocorrem para a formação dos poros. Em I, há a formação da camada de óxido barreira. Na etapa II, em destaque na faixa azul, há o início da nucleação dos poros, que ocorre efetivamente na etapa III. Em IV, há o crescimento dos poros.	16
Figura 5: Seção transversal idealizada de AAP.	17
Figura 6: Interferômetro com as placas refletoras (A) móveis, interferômetro de Fabry-Pérot, e (B) fixas, etalon Fabry-Pérot.	18
Figura 7: Espectros de (A) reflectância e de (B) fotoluminescência de AAP.	19
Figura 8: Espectro de interferências de um sensor de íons Au^{3+} antes e depois da detecção.	20
Figura 9: Componentes de um biossensor.	22
Figura 10: Reação entre duas moléculas de aminoácido e a formação da ligação peptídica.	23
Figura 11: Interação entre enzima com fenda de dimensões fixas e substrato com mesma configuração morfológica.	24
Figura 12: Enzima alterando sua conformação ao interagir com substrato.	24
Figura 13: Reação catalisada pela GOx.	25
Figura 14: Estrutura da GOx.	26
Figura 15: Esquema básico de uma célula eletrolítica para eletropolimento.	28
Figura 16: Diferença das espessuras do filme viscoso formado entre metal/eletrolito no pico e no vale da superfície da amostra que está sendo eletropolida. Quanto maior a espessura do filme, menor será o eletropolimento ocorrido naquela região devido a sua maior resistência elétrica.	29
Figura 17: (A) Célula eletroquímica de anodização composta de eletrólito e uma fonte de alimentação. (B) Detalhe dos eletrodos e a movimentação das cargas.	30
Figura 18: Reflectâncias (A) especular e (B) difusa.	32
Figura 19: Esquema de medição de emissão fluorescente.	33
Figura 20: (A) Posição da amostra de AAP no espectrofluorímetro para a deposição do filme LbL e para a cinética de crescimento da GOx. (B) Célula utilizada para a realização dos testes do biossensor e sua posição em relação à luz incidente no equipamento.	34

Figura 21: Esquema da técnica LbL. (A) Processo de adsorção da monocamada de poliânion seguido de lavagem do substrato. (B) Adsorção de uma camada de polication promovendo a formação de uma bicamada.	35
Figura 22: Esquema de deposição do colchão de PAH/PVS em AAP.	36
Figura 23: Esquema da deposição do filme de PAH/GO _x em AAP.	36
Figura 24: Esquema da estrutura do filme LbL em alumina anódica poro.	37
Figura 25: Esquema do primeiro teste do sensor de AAP modificado por LbL.	38
Figura 26: Esquema do segundo teste do sensor de AAP sem modificação por LbL.	38
Figura 27: Esquema das duas triplicatas dos testes de sensores de AAP com e sem modificação por LbL.	40
Figura 28: Curvas de duas etapas de anodização potenciostática.	42
Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura (A) topológica e (B) transversal de um alumínio 99,997% de pureza anodizado em duas etapas à 15°C, 40 V. A primeira etapa com duração de 2 horas e a segunda de 30 minutos, sendo seguida de 30 minutos de alargamento de poros. (Escala: 400 nm).	43
Figura 30: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total de filmes LbL contendo 10 bicamadas de PAH/GO _x	44
Figura 31: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total de filmes LbL contendo uma quadricamada de PAH/PVS/PAH/GO _x	45
Figura 32: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total referentes ao teste do biossensor em solução 0,001 mol.L ⁻¹ de glicose.	46
Figura 33: Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm referente ao teste do tempo de resposta do biossensor em solução 0,001 mol.L ⁻¹ de glicose.	46
Figura 34: Espectro de fotoluminescência obtido durante a cinética de crescimento da solução de GO _x (λ_{ex} de 280 nm).	47
Figura 35: Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm de (A) filme LbL de PAH/PVS/PAH/GO _x . Em (B), há as médias, entre esse filme e outros dois, das variações entre as intensidades de uma camada do filme LbL com a de AAP ($I_{PAH1} - I_{AAP}$, $I_{PVS} - I_{AAP}$, $I_{PAH2} - I_{AAP}$ e $I_{GOx} - I_{AAP}$).	48
Figura 36: Espectros de fotoluminescência, λ_{ex} de 280 nm, dos testes com várias concentrações de solução de glicose preparadas com soluções tampão fosfato de sódio de (A) 10 ⁻² mol.L ⁻¹ e (B) 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ . Detalhes das interferências de Fabry-Pérot dos testes dos biossensores em soluções tampão fosfato de sódio de (C) 10 ⁻² mol.L ⁻¹ e (D) 10 ⁻³ mol.L ⁻¹	49

Figura 37: (A) Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm do teste da amostra de AAP sem o filme de PAH/PVS/PAH/GOx em várias soluções de glicose. (B) Detalhe das interferências de Fabry-Pérot da AAP na presença de glicose.....	50
Figura 38: (A) Espectro de fotoluminescência original do teste do sensor de AAP sem filme LbL. (B) Espectro desse mesmo teste após a aplicação do algoritmo MSC. (λ_{ex} de 280 nm)..	52
Figura 39: Espectro de fotoluminescência do teste da AAP sem filme LbL em soluções de glicose de várias concentrações após tratamento com MSC e centralização pela média.....	52
Figura 40: Gráficos de (A) pesos e de (B) escores obtidos através da PCA sobre os espectros do teste de AAP em glicose processados por MSC e centralizados pela média. A PC1 está relacionada à intensidade de emissão e a PC2 está associada ao deslocamento dos espectros.	53
Figura 41: Esquema da aplicação do método de calibração multivariada PLS.....	54
Figura 42: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP sem modificação superficial (λ_{ex} de 280 nm). (A) Amostra 1. (B) Amostra 2. (C) Amostra 3.	55
Figura 43: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP sem modificação superficial (λ_{ex} de 320 nm). (A) Amostra 1. (B) Amostra 2. (C) Amostra 3.	58
Figura 44: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP com filme LbL (λ_{ex} de 280 nm). (A) Amostra 4. (B) Amostra 5. (C) Amostra 6.	61
Figura 45: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP com filme LbL (λ_{ex} de 320 nm). (A) Amostra 4. (B) Amostra 5. (C) Amostra 6.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com as reações por elas catalisadas.....	23
Tabela 2: Conjunto das concentrações das soluções precursoras dos filmes LbL.	35
Tabela 3: Concentrações das soluções de glicose utilizadas no teste do sensor da AAP sem modificação por LbL.	39
Tabela 4: Concentrações das soluções de glicose utilizadas no teste do sensor da AAP modificada por LbL.	39
Tabela 5: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.	56
Tabela 6: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.	56
Tabela 7: Valores de referência e previstos com o modelo PLS tratado com SNV das concentrações de glicose dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.	57
Tabela 8: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.	58
Tabela 9: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.	59
Tabela 10: Valores de referência e previstos com PLS das concentrações de glicose dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.	59
Tabela 11: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.	61
Tabela 12: Melhores resultados dos modelos PLS aplicados aos biossensores individualmente - λ_{ex} de 280 nm.	62
Tabela 13: Valores de referência e previstos com PLS das concentrações mais baixas de glicose do teste da amostra 6 de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.	62
Tabela 14: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.	63
Tabela 15: Melhores resultados dos modelos PLS aplicados aos biossensores individualmente - λ_{ex} de 320 nm.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Alumina anódica porosa
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GDL	D-glucono- δ -lactone
GOx	Glicose oxidase
λ	Comprimento de onda
L	Espessura
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
m	Ordem das oscilações
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MSC	Correção de espalhamento multiplicativo
n_{ef}	Índice de refração efetivo
PAH	Polialilamina hidrocloreada
PC	Componentes principais
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PLS	Mínimos quadrados parciais
PVS	Ácido poli(vinil sulfônico)
R	Coefficiente de correlação linear
RMSEP	Erro médio quadrático de previsão
SNV	Varição normal padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	ALUMINA ANÓDICA POROSA (AAP).....	14
2.2	BIOSENSORES	21
2.3	ENZIMAS.....	23
2.4	GLICOSE OXIDASE	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	ELETROPOLIMENTO	28
4.2	ANODIZAÇÃO	29
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	30
4.4	REFLECTÂNCIA	31
4.5	FLUORESCÊNCIA.....	32
4.6	FILMES <i>LAYER-by-LAYER</i> (LbL).....	34
4.7	TESTES DO BIOSENSOR	37
4.8	ANÁLISE MULTIVARIADA	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia foca a caracterização, a produção e as aplicações de sistemas que se apresentam em escala manométrica ^[1]. Ela tem se destacado em pesquisas científicas através da utilização de estruturas ordenadas como nanoporos ^[2-4], nanotubos ^[5-8] e nanofios ^[9, 10], que podem ter periodicidade menor do que 100 nm e que são financeiramente acessíveis ^[11]. Essas pesquisas estão progredindo devido ao interesse na miniaturização de dispositivos e ao desenvolvimento de técnicas instrumentais que permitem a manipulação e visualização em nanoescala ^[11]. Essa redução das dimensões e o controle sobre a geometria dos materiais nanoestruturados proporcionam novas propriedades catalíticas, eletrônicas, magnéticas, optoeletrônicas e mecânicas, que favorecem as aplicações desses nanomateriais nos ramos de nanofotônica ^[12, 13], fotocatalise ^[14, 15], microfluídica ^[15, 16] e sensores ^[11, 17, 18].

Dentre os materiais nanoestruturados que vêm se destacando, há a alumina anódica porosa (AAP) obtida através da anodização do alumínio e que consiste de uma nanoestrutura ordenada composta de células hexagonais com nanoporos cilíndricos no centro ^[11, 19, 20]. Esse óxido de alumínio obtido pelo processo de anodização pode ser utilizado em capacitores eletrolíticos ^[21, 22], no aumento da resistência à corrosão de materiais ^[23, 24] e como camadas decorativas através da incorporação de pigmentos ^[11, 25, 26]. A primeira caracterização da AAP foi realizada por Keller *et al.* ^[19] em 1953, que analisaram a estrutura do óxido poroso de alumínio por microscopia eletrônica ^[20]. Em 1968, Diggle *et al.* ^[27] descreveram o primeiro modelo teórico a respeito da formação dos dois tipos de óxidos, barreira e poroso, que compõem o filme de óxido anódico de alumínio ^[20]. A partir de 1995, as pesquisas relacionadas à AAP se expandiram devido ao processo de anodização em duas etapas desenvolvido por Masuda e Fukuda ^[28], o que possibilitou a obtenção de estruturas bem ordenadas com geometria controlada e com baixo custo de fabricação ^[20].

Recentemente, a AAP vem sendo estudada como plataforma na fabricação de sensores ^[29] devido ao efeito de Fabry-Pérot característico de suas respostas ópticas às espectroscopias de reflectância ^[30-33] e de fotoluminescência ^[31, 34]. Além de apresentar essas respostas ópticas, a geometria dos poros da AAP pode ser controlada de acordo com os parâmetros de anodização como o pH e a temperatura do eletrólito, o tempo de anodização e o modo de energia aplicada (corrente constante, potencial constante ou pulso de potencial) ^[11, 20, 35, 36]. Esse controle na geometria dos poros é interessante quando aplicado na fabricação de sensores, pois a modificação na estrutura da AAP pode alterar a sensibilidade da resposta óptica em relação ao analito ou aos interferentes quando se testa o sensor ^[36, 37]. Além disto, ainda para o ramo de

sensores, pode-se alterar a superfície dos poros com o intuito de melhorar a especificidade em relação ao analito [36]. Essa alteração pode ser realizada através da ancoragem de grupos funcionais na AAP [36, 38], com modificação por plasma [39, 40] e também por deposição de filmes ultrafinos através de automontagem por adsorção física, via *Layer-by-Layer* (LbL) [41]. Essa última técnica de automontagem de multicamadas de polieletrólitos, LbL, vem se destacando por ser uma técnica simples, consistindo na adsorção em meio aquoso de camadas de espécies com cargas opostas, e também por necessitar de pouca quantidade de material, gerando camadas com espessuras nanométricas, proporcionando alta interação entre as moléculas [42, 43].

Esse processo de preparo dos filmes automontados teve como base as ideias de Iler *et al.* [44], em 1966, que trabalharam com a adsorção alternada de partículas coloidais de cargas opostas [42]. Outra pesquisa importante para o aprimoramento da técnica LbL foi a de Sagiv *et al.* [42] na década de 80, que descreveram a formação de sistemas de multicamadas, demonstrando a possibilidade de se obter filmes constituídos por monocamadas quimicamente adsorvidas através de ligações covalentes [42]. Na década de 90, Decher *et al.* [43, 45, 46] propuseram a automontagem de multicamadas através de interações físicas de moléculas com grupos iônicos, ou seja, em interações eletrostáticas com polieletrólitos [42].

A técnica LbL resulta em filmes ultrafinos com ordem molecular e estabilidade proporcionadas por forças eletrostáticas. Esses filmes nanoestruturados podem ser fabricados a partir de soluções orgânicas [47] e inorgânicas [48] e podem ser utilizados para a obtenção de biossensores quando compostos de materiais biológicos como enzimas, anticorpos, proteínas e ácidos nucleicos [49]. A deposição desse tipo de material é possível pois, durante a fabricação do filme, há o aprisionamento de água na estrutura desse filme LbL e a temperatura, as concentrações e o pH das soluções podem ser controlados, o que possibilita a obtenção de um ambiente favorável às biomoléculas, prevenindo a desnaturação ou diminuição de sua atividade [42, 47, 50, 51].

O primeiro biossensor foi descrito na literatura em 1962 por Clark e Lyons [52] que, através de um sistema de eletrodos, monitoraram, quantitativamente, o pH e as pressões parciais de oxigênio e de dióxido de carbono do sangue de pacientes cirúrgicos. Além disto, eles trabalharam na deposição de uma fina camada da enzima glicose oxidase (GOx) em um eletrodo de oxigênio com uma membrana semipermeável, o que possibilitou o monitoramento da concentração de glicose através da diminuição da concentração de oxigênio [53, 54]. Após esse trabalho, várias pesquisas foram realizadas visando à fabricação de biossensores [55-59], sendo que um dos materiais biológicos mais utilizados com essa finalidade é a enzima glicose oxidase (GOx) [60-62], que apresenta alta especificidade à glicose, boa estabilidade e baixo custo de

obtenção em relação a outras enzimas [51, 53, 61]. Os sensores de glicose são interessantes para a indústria e para a população podendo ser utilizados no diagnóstico de doenças e pela indústria alimentícia [63, 64].

O diabetes mellitus é uma dessas doenças, sendo um distúrbio metabólico relacionado à deficiência de insulina, ocasionando um aumento na quantidade de glicose no sangue [65]. O nível de glicose de uma pessoa em jejum considerado normal é abaixo de $(5,6 \times 10^{-3}) \text{ mol.L}^{-1}$. Pessoas em jejum com níveis de glicose entre $(5,6 \times 10^{-3}) \text{ mol.L}^{-1}$ e $(6,9 \times 10^{-3}) \text{ mol.L}^{-1}$ são consideradas pré-diabéticas. Nível de glicose acima de $(6,9 \times 10^{-3}) \text{ mol.L}^{-1}$ é considerado caso de diabetes [66]. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, no ano de 2014, essa doença foi diagnosticada em cerca de 387 milhões de pessoas no mundo, com 4,9 milhões de óbitos e despesa de 612 bilhões de dólares no ano [67]. Analisando essas estatísticas é possível justificar o grande interesse em pesquisas científicas que visam ao desenvolvimento de sensores de glicose mais sensíveis, seletivos e de baixo custo [68-70].

O trabalho apresentado nessa dissertação tem como intuito a fabricação de um biossensor óptico de glicose através do preparo de filmes LbL contendo a enzima GOx. A plataforma utilizada para a deposição do filme foi a AAP e a resposta do biossensor foi analisada a partir de possíveis mudanças nas propriedades ópticas desse substrato. Essas mudanças puderam ser visualizadas através de alterações nas interferências de Fabry-Pérot obtidas com as técnicas de fotoluminescência e de reflectância total. As alterações nos espectros também foram avaliadas por métodos de análise multivariada, tais como a análise de componentes principais (PCA, do inglês “principal component analysis”) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês “partial least squares”) [71].

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ALUMINA ANÓDICA POROSA (AAP)

O alumínio sofre naturalmente uma reação de oxidação quando exposto ao oxigênio do ar, levando à formação de uma fina camada de óxido de alumínio com espessura entre 2 nm e 3 nm. Essa camada confere ao material alto grau de proteção e isolamento elétrico e é denominada de óxido barreira ou camada de óxido passivo [72, 73]. O processo de oxidação na superfície do metal pode ocorrer também de maneira intensificada por passagem de corrente ao se utilizar o alumínio como ânodo em uma solução eletrolítica. Esse processo de oxidação promovida é denominado de anodização e pode resultar nos filmes tipo barreira e tipo poroso. Dependendo das condições de anodização, sendo aceito o eletrólito como principal fator de influência, o filme final obtido pode ter apenas a morfologia do óxido barreira, Figura 1 (A), ou pode apresentar também a morfologia do óxido poroso, Figura 1 (B). Os eletrólitos que são utilizados nas anodizações podem ser classificados em dois tipos. Os primeiros são denominados de eletrólitos neutros com pH variando entre 5 e 7, que resultam em filmes tipo barreira por não afetarem quimicamente a camada de óxido obtida com a anodização. Já com eletrólitos ácidos e com alguns alcalinos [35], as anodizações resultam no filme tipo poroso, pois esses eletrólitos afetam quimicamente a camada de óxido barreira através de dissolução assistida por campo elétrico [11]. Três dos eletrólitos mais utilizados para a obtenção da AAP altamente organizada são o ácido fosfórico (H_3PO_4) [74, 75], o ácido sulfúrico (H_2SO_4) [76, 77] e o ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) [20, 75, 77-79].

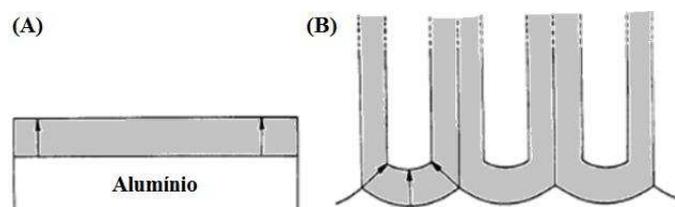


Figura 1: Óxidos dos tipos (A) barreira e (B) poroso obtidos através da anodização de alumínio [35].

A anodização do alumínio está relacionada ao transporte dos íons Al^{3+} e O^{2-} pela interface alumínio-óxido, pela camada de óxido barreira e pela interface óxido-eletrólito, Figura 2. Com a geração do campo elétrico, o alumínio perde elétrons para o eletrólito e há a formação de íons Al^{3+} , que tendem a ser atraídos em direção ao eletrólito. Já os íons O^{2-} são provenientes

do eletrólito e tendem a ir em direção ao campo elétrico. Esses dois íons resultam na formação do óxido de alumínio, Al_2O_3 [11, 20, 80].

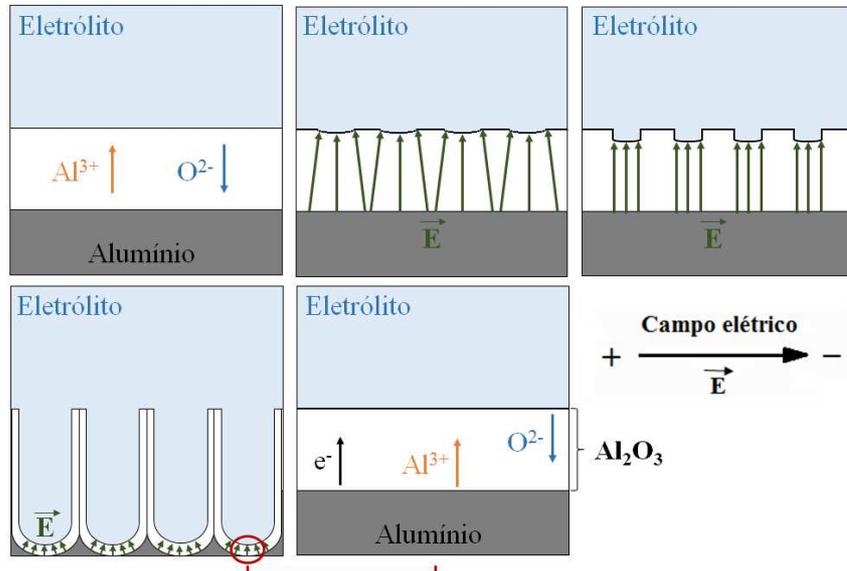


Figura 2: Esquema de crescimento dos poros durante anodização [20].

Analisando como a formação do óxido poroso ocorre, tem-se que o poro pode ser dividido em duas regiões quimicamente distintas, Figura 3 [20, 81-85]. A região mais externa do poro é composta por alumina pura. Já a região que fica entre a interface alumina-eletrólito e a região mais interna apresenta impurezas provenientes do eletrólito, como as espécies aniônicas de oxalato, fosfato e sulfato, dependendo do eletrólito utilizado [20, 81, 83, 85].

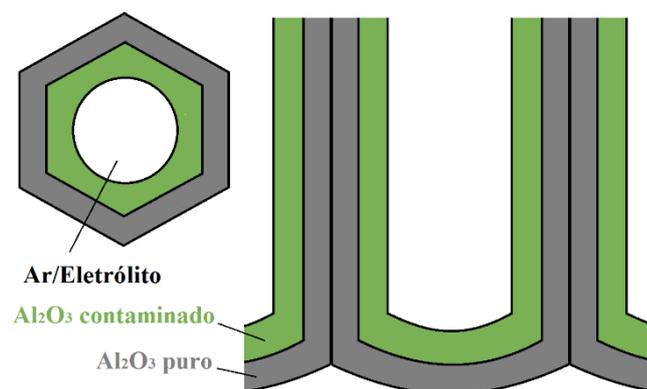


Figura 3: Duas regiões quimicamente distintas que compõem o poro [20].

A curva obtida durante a anodização potencioestática (aplicação de potencial constante) pode ser analisada em quatro etapas, Figura 4. Nos primeiros segundos, I na Figura 4, há uma queda da densidade de corrente que corresponde à formação da camada fina e compacta de

Al_2O_3 . Na segunda etapa, a densidade de corrente alcança um mínimo, II na Figura 4, devido à instabilidade no campo elétrico que dissolve parcialmente o óxido barreira, gerando sítios correspondentes ao início da nucleação de poros. Posteriormente, a densidade de corrente aumenta até um ponto máximo, III na Figura 4, indicando a nucleação dos poros. Na etapa final, IV na Figura 4, há uma queda suave na densidade de corrente até ela alcançar um valor constante, correspondendo ao crescimento dos poros [20, 86].

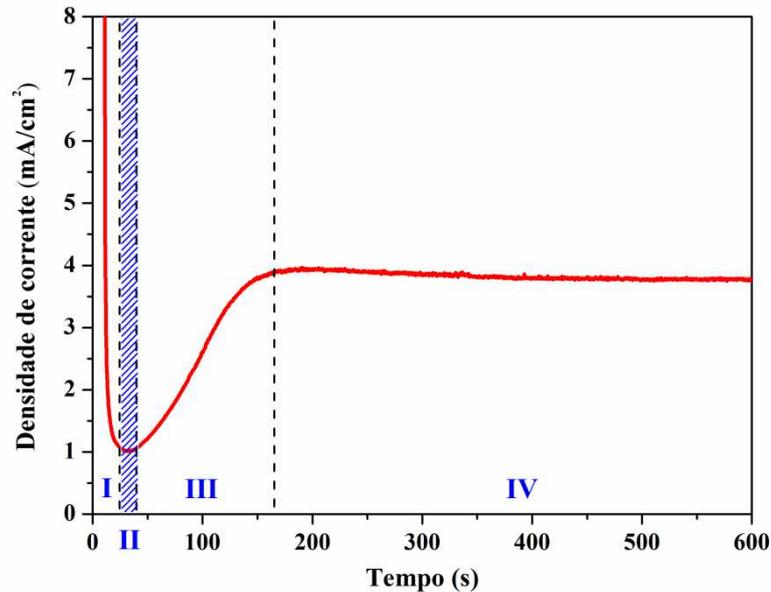


Figura 4: Curva de anodização potencioestática dividida em quatro processos que ocorrem para a formação dos poros. Em I, há a formação da camada de óxido barreira. Na etapa II, em destaque na faixa azul, há o início da nucleação dos poros, que ocorre efetivamente na etapa III. Em IV, há o crescimento dos poros [20, 87].

A estrutura da AAP pode ser caracterizada a partir do diâmetro dos poros, distância entre poros, porosidade e espessura da camada porosa, Figura 5. Essas características podem ser controladas através dos parâmetros de anodização como tempo do processo, potencial aplicado, temperatura e concentração do eletrólito [20, 27, 36, 78]. O tempo de anodização é diretamente proporcional à espessura do óxido poroso, que influencia, como será visto, nas propriedades ópticas da AAP [11, 36, 88]. O controle do potencial aplicado é importante porque se o potencial for muito alto, a camada de óxido barreira pode ser destruída, o que afeta a homogeneidade dos poros. Isto pode ocorrer por três razões: (i) devido ao aumento da condutividade no óxido barreira na base dos poros por causa do aquecimento local, (ii) em razão da maior ionização dos átomos, geração de mais elétrons, causada pela energia do campo elétrico e (iii) devido à possíveis rupturas no óxido barreira a partir de rachaduras pré-existentes [20, 89]. O potencial aplicado também é importante porque influencia de maneira direta na distância entre poros, que pode variar de 50 a 500 nm e, como o potencial aplicado está relacionado à condutividade do

eletrólito para prevenir rupturas no óxido, a distância entre poros varia também de acordo com o eletrólito utilizado. Já o diâmetro dos poros pode ser controlado através do pH do eletrólito, que é dependente do seu tipo e de sua concentração. Quando o pH do eletrólito é baixo, o potencial aplicado durante a anodização também precisa ser, levando a uma menor dissolução assistida do óxido barreira pelo campo elétrico e, conseqüentemente, a poros com menores diâmetros. Como exemplo é possível comparar três dos eletrólitos mais utilizados, H_3PO_4 , H_2SO_4 e $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. As condutividades desses ácidos decrescem na ordem de $\text{H}_2\text{SO}_4 > \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 > \text{H}_3\text{PO}_4$. Dessa forma, o potencial máximo que pode ser aplicado quando se utiliza o H_2SO_4 é menor do que quando se utiliza o $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, que é menor do que quando se usa o H_3PO_4 , sendo que os intervalos ideais para a obtenção de AAP ordenada seriam de 5 V a 40 V para o H_2SO_4 , de 30 V a 140 V para o $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ e de 80 V a 200 V para o H_3PO_4 . Assim, anodizações usando H_2SO_4 como eletrólito resultam em filmes de AAP com poros de diâmetros menores do que quando o eletrólito é o H_3PO_4 [20].

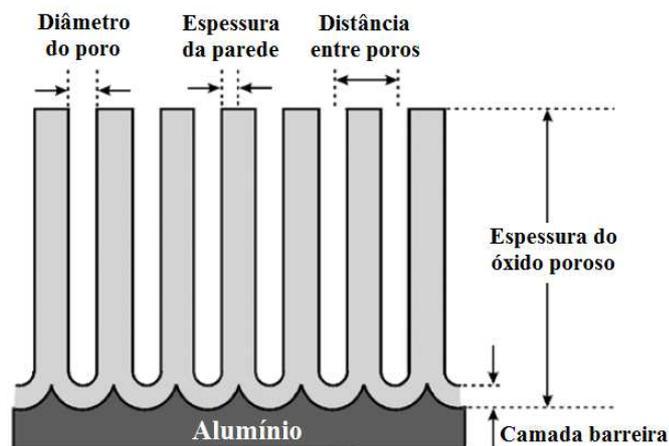


Figura 5: Seção transversal idealizada de AAP [11].

Esse controle na morfologia dos poros é importante porque ela interfere nas respostas ópticas da AAP, que são interessantes para possíveis aplicações na área de sensores [36, 88]. Essas respostas ópticas são caracterizadas pelo fenômeno de guias de onda de Fabry-Pérot, que são baseadas nas interferências de múltiplos feixes [90]. O interferômetro de Fabry-Pérot é um dispositivo que foi desenvolvido em 1897 pelos físicos Charles Fabry e Alfred Pérot e consiste basicamente de duas placas refletoras semitransparentes de vidro ou de quartzo que ficam paralelamente dispostas com uma distância que pode variar, Figura 6 (A). Esse interferômetro também é chamado de etalon Fabry-Pérot quando os dois espelhos possuem uma distância fixa,

Figura 6 (B). O interferômetro fica entre uma lente colimadora, que direciona e suaviza feixes de radiação, e uma lente focalizadora, que converge a radiação ^[90-92].

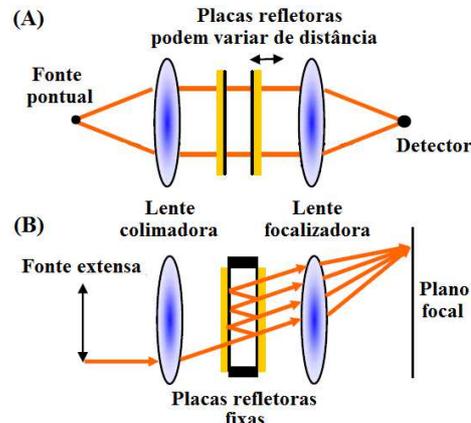


Figura 6: Interferômetro com as placas refletoras (A) móveis, interferômetro de Fabry-Pérot, e (B) fixas, etalon Fabry-Pérot ^[90].

Dessa forma, com as reflexões de múltiplos feixes dentro da cavidade óptica formada pelas duas placas refletoras, há a ocorrência de interferências construtivas e destrutivas que resultam em espectros caracterizados por oscilações. A AAP é semelhante a essa cavidade óptica do interferômetro de Fabry-Pérot e, dependendo de sua morfologia, apresenta respostas ópticas com a presença dessas oscilações à técnicas como de reflectância ^[30, 34] e de fotoluminescência ^[34, 88], Figura 7. Um dos parâmetros morfológicos da AAP que influencia na obtenção das interferências é a espessura da camada de óxido poroso, sendo que a máxima para que as oscilações sejam obtidas é de 25 μm ^[88]. Outros parâmetros morfológicos que exercem influência são o diâmetro do poro, que precisa ter um tamanho entre 30 nm e 70 nm ^[93], e a porosidade, que precisa ser no máximo de 40% ^[88].

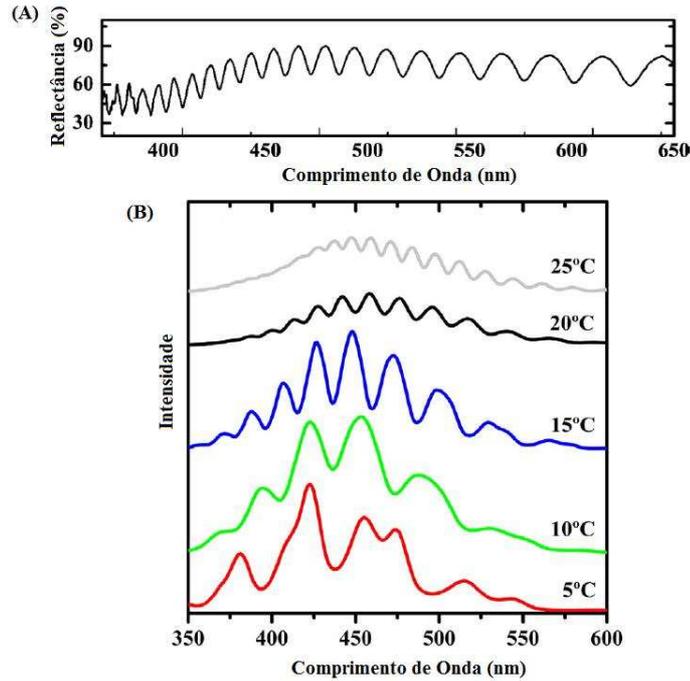


Figura 7: Espectros de (A) refletância e de (B) fotoluminescência de AAP [34, 94].

As interferências de Fabry-Pérot são regidas pela Equação 1, em que m é a ordem das oscilações, λ é o comprimento de onda máximo de cada interferência, n_{ef} é o índice de refração efetivo, L é a espessura da cavidade óptica e θ é o ângulo de incidência da radiação. Assim, essa equação relaciona dados obtidos através do espectro (m e λ) com características da amostra (n_{ef} e L) e com parâmetros do equipamento (θ). Analisando a Equação 1 para aplicação no ramo de sensores, tem-se que, quando o analito entrar em contato com o sensor, haverá alterações nos valores de n_{ef} , que resultarão em deslocamento das interferências de Fabry-Pérot em termos de λ que pode ser analisado como resposta óptica de sensores [30-32, 37, 95, 96]. Dessa forma, mudanças nas oscilações podem ser avaliadas como respostas ópticas qualitativas de sensores e podem também fornecer dados (m e λ) para se obter o n_{ef} . Essas alterações nas interferências de Fabry-Pérot foram visualizadas após a detecção de íons ouro (III) (Au^{3+}) em trabalho de Kumeria *et al.* [32]. A Figura 8 ilustra o deslocamento do espectro de interferências para maiores comprimentos de onda após o contato da AAP com os íons Au^{3+} . Esse deslocamento foi interpretado como a resposta do sensor e foi atribuído à mudança no índice de refração do substrato AAP [32].

$$m \cdot \lambda = 2 \cdot \cos\theta \cdot n_{ef} \cdot L \quad \text{Eq. 1}$$

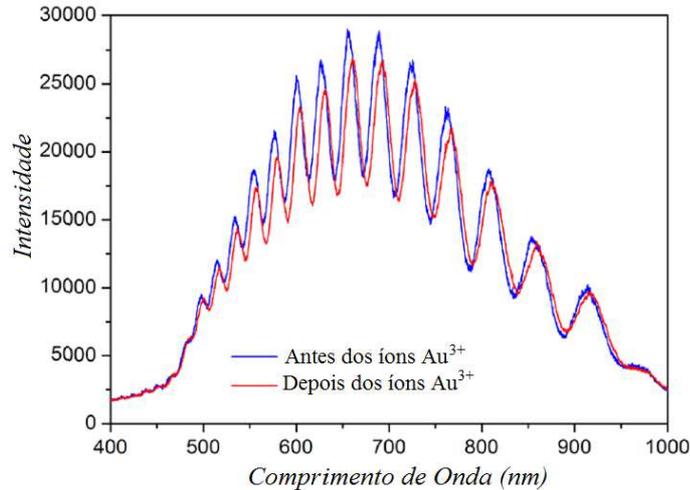


Figura 8: Espectro de interferências de um sensor de íons Au^{3+} antes e depois da detecção [32].

Uma forma alternativa de análise da resposta de sensores com a AAP consiste no emprego de técnicas de análise multivariada. O uso dessas técnicas na avaliação de dados de origem química é denominado de Quimiometria. Essa especialidade da Química planeja experimentos de maneira otimizada e analisa de forma multivariada os dados experimentais utilizando ferramentas estatísticas e matemáticas [97, 98]. Uma das vantagens da análise multivariada é a capacidade de extrair mais informações dos dados obtidos, pois considera as relações entre as variáveis analisadas simultaneamente. Os dados para análise multivariada são organizados em uma matriz X , em que as linhas são o conjunto das amostras e as colunas são as variáveis medidas. Essa matriz X pode ser representada espacialmente considerando cada variável medida como uma dimensão do espaço e cada amostra como um ponto no espaço. Dessa forma, é possível a observação das relações entre as amostras e/ou variáveis e identificação de padrões de associação entre elas. Uma das técnicas mais empregadas para esse tipo de tarefa é a PCA. Ela é uma técnica de reconhecimento de padrões não-supervisionada que manipula matematicamente a matriz de dados a fim de condensar as muitas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis denominadas fatores ou componentes principais (PC, do inglês “principal component”). As PCs descrevem o máximo de variância presente nos dados originais. Basicamente, a PCA resulta na decomposição da matriz de dados original em termos do produto de novas matrizes denominadas escores e pesos. Os escores fornecem as posições das amostras no espaço determinado pelas componentes principais. Assim, o gráfico de escores ilustra a relação das amostras entre si de acordo com um determinado número de PCs. Já os pesos são a importância de cada variável na construção de cada PC. Portanto, o gráfico de pesos ilustra a relação das variáveis entre si. Dessa forma, com

a análise conjunta dos escores e pesos é possível verificar a influência de cada variável em cada amostra [99-101].

Além de permitir avaliações qualitativas, há técnicas quimiométricas que permitem o estabelecimento de relações quantitativas entre os dados químicos obtidos de um sistema e uma propriedade do mesmo. Conhecidas como técnicas de calibração multivariada, buscam construir um modelo matemático que descreva uma propriedade de interesse (variável dependente, matriz Y) em determinadas amostras em função de um sinal analítico multivariado (variáveis independentes, matriz X). Assim, é possível utilizar esse modelo em amostras em que essa propriedade é desconhecida a fim de quantificá-la. A regressão PLS é uma das técnicas de calibração multivariada mais empregada e é baseada na obtenção de fatores análogos às componentes principais. Entretanto, diferentemente da PCA em que só as informações presentes em X constituem as PCs, os fatores na regressão PLS são construídos de forma a maximizar a correlação entre os escores decorrentes da decomposição de X e de Y [102-104].

Dessa forma, a viabilidade da aplicação da AAP como plataforma de sensores ópticos pode ser verificada através da resposta de um desses sensores. Essa resposta pode ser analisada qualitativamente pela observação do comportamento dos espectros de fotoluminescência ou de reflectância e pode ser analisada quantitativamente por quimiometria, sendo que os resultados dos dois métodos podem ser comparados. Além disso, a utilização da AAP como plataforma para a fabricação de sensores ópticos é interessante devido a sua resistência química, estabilidade térmica, dureza, biocompatibilidade e grande área superficial que facilita a interação com o analito. Outra vantagem de se utilizar a AAP como substrato para sensores é a dela apresentar boa organização morfológica com a possibilidade de se manipular as dimensões de seus poros [29, 36, 88].

2.2 BIOSSENSORES

O sensor óptico, que é o foco desse trabalho, tem atraído atenção por apresentar importância industrial [105-106], ambiental [106, 107] e biomédica [108-110]. Esses sensores envolvem a combinação de reconhecimentos químico e biológico com o avanço de tecnologias optoeletrônicas [110]. Quando o reconhecimento se dá por um material biológico tem-se o biossensor, que é um dispositivo analítico constituído basicamente de três partes. A primeira delas é um elemento de reconhecimento biológico, denominado biorreceptor, que diferencia o analito de possíveis interferentes. A segunda parte é o transdutor, que é acoplado ao biorreceptor e tem por finalidade converter a resposta do reconhecimento biológico em um sinal mensurável.

A terceira parte é um sistema de processamento de sinal que torna a informação que foi medida pelo transdutor em um sinal legível [51, 53, 111]. Os biossensores são classificados em enzimáticos, imunossensores, genossensores, de acordo com o tipo de biorreceptor e também podem ser divididos em ópticos, elétricos, eletroquímicos, térmicos, de acordo com o método de transdução utilizado [51, 53, 112]. A Figura 9 ilustra os possíveis componentes de um biossensor.

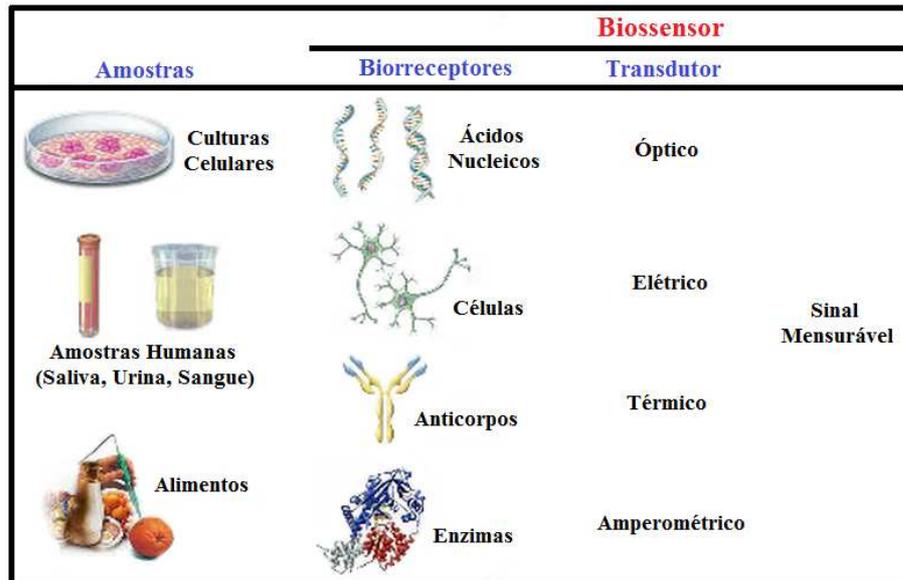


Figura 9: Componentes de um biossensor [51, 112].

Nos biossensores ópticos a transdução em biossensores ópticos envolve uma interação química entre o biorreceptor e o analito que produz um sinal opticamente detectável [113, 114]. Alguns métodos de transdução que podem ser utilizados em sensores ópticos são reflectância, luminescência, absorbância e fotoluminescência. As medidas podem ser realizadas em várias regiões do espectro eletromagnético como ultravioleta, visível, infravermelho e infravermelho próximo, e alguns parâmetros que podem ser analisados como resposta do sensor são intensidade da luz, tempo de vida, índice de refração, espalhamento, difração e polarização [114]. Os biossensores ópticos são vantajosos, pois são baratos, não destrutivos, de fácil miniaturização e permitem várias análises ao mesmo tempo [110, 114]. Entretanto, a luz do ambiente pode interferir nas medidas e eles apresentam estabilidade em longo prazo limitada pelo biorreceptor [114]. Para as aplicações dos sensores, a radiação precisa interagir com o analito através de absorção, fluorescência, fosforescência, reflexão ou refração. As técnicas que envolvem absorção e emissão da radiação (fluorescência, fosforescência) são as mais utilizadas, sendo as de emissão as mais vantajosas por apresentarem alta sensibilidade e boa especificidade.

2.3 ENZIMAS

As enzimas são uma classe de proteínas altamente especializadas. Elas catalisam as reações químicas que constituem o metabolismo intermediário das células, sem alterar o ponto de equilíbrio dessas reações. Por serem catalisadores, elas não sofrem alterações permanentes e não são consumidas com a catálise. Como todas as enzimas são proteínas, elas podem sofrer perda de atividade catalítica se algum fator afetar sua estrutura nativa. Alguns fatores que podem ocasionar essa desnaturação são o aquecimento dessas enzimas e o tratamento com ácidos ou bases fortes [115].

Há seis classes de enzimas que são organizadas de acordo com as reações que elas catalisam, Tabela 1.

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com as reações por elas catalisadas [51, 115].

Número	Classe	Reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Transferências de grupos funcionais
3	Hidrolases	Reação de hidrólise
4	Liases	Adição à duplas ligações
5	Isomerases	Formação de isômeros com transferência de grupos da mesma molécula
6	Ligases	Formação de ligações com quebra de ATP

As enzimas são constituídas de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas [116], Figura 10, e elas podem conter um cofator que é um componente químico necessário para sua atividade [115]. Esse cofator pode ser um metal ou uma molécula orgânica chamada de coenzima e muitas vezes pode estar ligado fortemente à parte proteica da enzima, sendo chamado de grupo prostético [115].

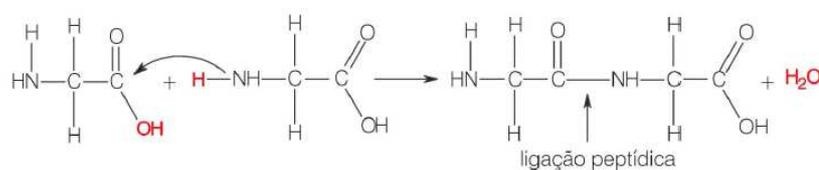


Figura 10: Reação entre duas moléculas de aminoácido e a formação da ligação peptídica [115].

O sítio ativo é a região em que o substrato (analito) se liga para que ocorra a catálise. Essa ligação pode ocorrer através de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals. A especificidade da ligação entre enzima e substrato depende do arranjo dos átomos no sítio ativo, sendo que a estrutura tridimensional da enzima possibilita um encaixe perfeito com o analito. Há dois modelos que propõem explicar a especificidade enzimática. O primeiro deles é o modelo chave-fechadura, Figura 11, em que é proposto que as enzimas possuem fendas com dimensões fixas que permitem apenas a acomodação de compostos com essa mesma configuração. Assim, substâncias que possuam grupos funcionais iguais aos do substrato verdadeiro, mas que não se encaixem na fenda, não interagem com a enzima. O segundo é o modelo do encaixe induzido, Figura 12, em que o sítio ativo não possui uma forma fixa e a interação do substrato com a enzima altera a posição dos aminoácidos catalíticos. Dessa forma, há a formação de um sítio ativo com estrutura capaz de interagir com o analito ^[117].

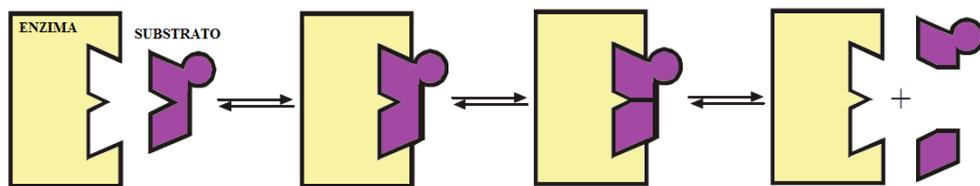


Figura 11: Interação entre enzima com fenda de dimensões fixas e substrato com mesma configuração morfológica ^[117].

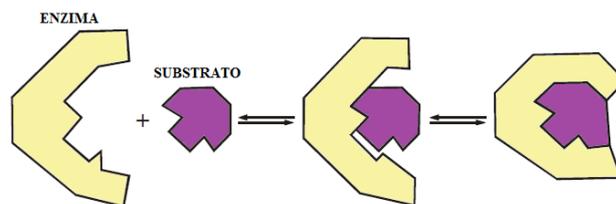


Figura 12: Enzima alterando sua conformação ao interagir com substrato ^[117].

Dependendo do pH do meio, as enzimas podem adquirir cargas elétricas devido aos grupos ionizáveis das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. O pH que apresenta a quantidade de cargas negativas igual a quantidade de cargas positivas é chamado de ponto isoelétrico (pI) da enzima. Quando o pH é maior do que o pI, a enzima apresenta carga negativa. Quando o pH é menor do que o pI, a enzima apresenta carga positiva ^[51, 118]. Além disso, há o chamado pH ótimo da enzima, em que ela apresenta atividade catalítica máxima. Essa atividade está relacionada à ionização de aminoácidos que compõem o sítio ativo. Se a enzima precisa da cadeia lateral do grupo amino protonada e o pH estiver alcalino, o que ocasiona a perda do

próton, a atividade enzimática diminui ^[117]. Dessa forma, o pH é um fator importante que precisa ser controlado quando se trabalha com enzimas.

2.4 GLICOSE OXIDASE

Em 1928, Müller reportou a atividade da enzima glicose oxidase (GOx) em extratos do fungo *Aspergillus niger* ^[63, 119]. Atualmente, sabe-se que essa enzima é produzida por alguns fungos e insetos e que um dos produtos gerados em sua reação catalítica, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atua como agente bactericida ^[63]. A GOx é uma flavoproteína, possuindo em sua estrutura a coenzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ^[63, 120]. Ela é uma enzima pertencente à classe das oxirredutases e catalisa a reação da oxidação pelo O_2 da β -D-glicose ($C_6H_{12}O_6$) em D-glucono- δ -lactone ($C_6H_{10}O_6$), Figura 13, que hidrolisa espontaneamente a ácido glucônico. A reação enzimática pode ser dividida em uma etapa de redução e em uma de oxidação em relação à coenzima FAD. Na reação de redução, a GOx catalisa a oxidação da β -D-glicose em D-glucono- δ -lactone e a FAD é reduzida à $FADH_2$. Na etapa de oxidação, a $FADH_2$ é oxidada, gerando H_2O_2 ^[64].

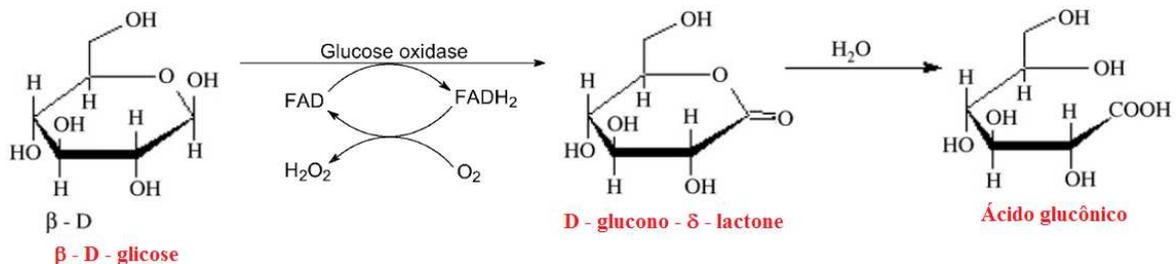


Figura 13: Reação catalisada pela GOx ^[64].

A GOx, Figura 14, é um homodímero que possui um diâmetro médio de 8 nm ^[119]. A unidade monomérica da enzima possui formato esferoide com dimensões de 60 Å x 52 Å x 37 Å ^[51]. A GOx da *Aspergillus niger* apresenta boa atividade em um intervalo de pH de 3,5 a 6,5 ^[121] e ela possui um pI de 4,2 ^[121-123]. Dessa forma, na fabricação de filmes LbL, se a enzima estiver em uma solução com pH abaixo de 4,2, a solução será catiônica, e se a enzima estiver em solução com pH maior do que 4,2, a solução será aniônica.

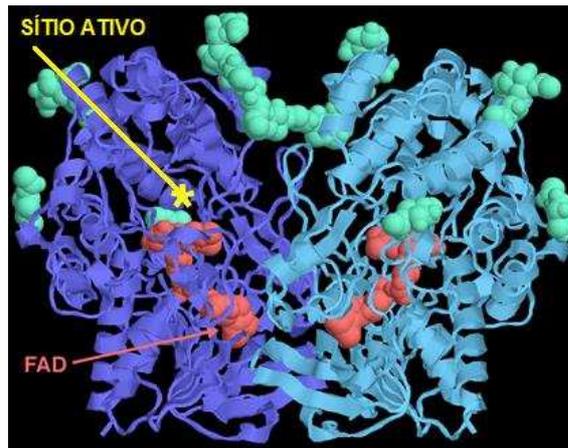


Figura 14: Estrutura da GOx [124].

A GOx está presente em diversas pesquisas científicas no ramo de desenvolvimento de biossensores de glicose para análises clínicas e alimentícias, sendo assim de importância tanto para a população quanto para a indústria [63, 64, 125, 126]. Devido à importância da GOx, o trabalho demonstrado nessa dissertação tem por intuito unir as vantagens da utilização dessa enzima na fabricação de biossensores com as potencialidades apresentadas pela AAP como plataforma para sensores ópticos, visando à obtenção de um biossensor óptico de glicose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

✓ Modificar a superfície da alumina anódica porosa depositando filmes LbL de polialilamina hidrocloreada (PAH) e de GOx com um colchão de PAH e de ácido poli(vinil sulfônico) (PVS), a fim de se fabricar um biossensor óptico de glicose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Preparar as amostras de AAP a partir da anodização potencioestática do alumínio em condições favoráveis à obtenção das oscilações de Fabry-Pérot nos espectros de fotoluminescência e de reflectância total.

✓ Testar as concentrações das soluções precursoras do filme LbL para que a deposição em AAP seja possível e não obstrua os poros.

✓ Realizar a cinética de crescimento de filme de GOx em substrato de AAP.

✓ Fabricar os filmes LbL de PAH/GOx com um colchão de PAH/PVS.

✓ Testar o filme LbL como um biossensor óptico de glicose, averiguando quais concentrações de solução do analito ocasionam alterações nas interferências de Fabry-Pérot.

✓ Analisar os resultados dos testes dos sensores utilizando os conceitos envolvidos pela equação de Fabry-Pérot e por técnicas quimiométricas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ELETROPOLIMENTO

Em 1912 houve uma primeira referência histórica sobre o eletropolimento, que foi realizado na prata com soluções de cianetos. Em 1935, o cobre foi eletropolido. A partir de então, entre 1936 e 1937, Faust e outros pesquisadores desenvolveram métodos para eletropolir aço inoxidável e outros metais. De 1940 a 1955, diversos procedimentos que possuíam como base o eletropolimento foram patenteados com fins de aplicações militares ^[127].

Atualmente, o eletropolimento é um processo de acabamento superficial que, além de amenizar a rugosidade da superfície, melhora sua aparência, sua refletividade e sua resistência à corrosão. Esse procedimento pode ser realizado antes de uma anodização e de uma eletrodeposição e remove a camada de material deformado devido a corte e a polimento abrasivo. O processo de eletropolimento, Figura 15, consiste em imergir a amostra em uma solução eletrolítica e conectá-la ao terminal positivo da fonte de alimentação. A fim de completar o circuito, contra-eletrodos de material inerte são ligados ao terminal negativo da fonte e são dispostos na mesma solução eletrolítica em que se encontra a amostra ^[128].

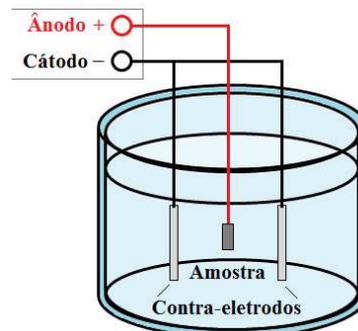


Figura 15: Esquema básico de uma célula eletrolítica para eletropolimento ^[128].

Jacquet ^[129], em 1936, desenvolveu uma teoria para explicar a diminuição dos picos de rugosidade de um material eletropolido. Segundo essa teoria, quando um metal é conectado como ânodo em uma célula eletrolítica, há a formação de um filme viscoso na superfície da amostra devido à reação metal/eletrolito que ocorre. A resistência elétrica desse filme viscoso é maior do que a de todo o resto do sistema englobado pela solução eletrolítica. Assim, tem-se que quanto maior for a espessura desse filme, maior será a resistência elétrica ^[128, 130].

Nos picos de rugosidade, a espessura dessa camada viscosa é menor do que no vale da superfície do metal, Figura 16, ou seja, a resistência elétrica sobre os picos é menor do que a sobre os vales. Dessa forma, a corrente elétrica que passa sobre os picos de rugosidade será maior do que a que passa sobre os vales, promovendo uma suavização desses picos e, conseqüentemente, uma redução da rugosidade da superfície do metal [128, 130].

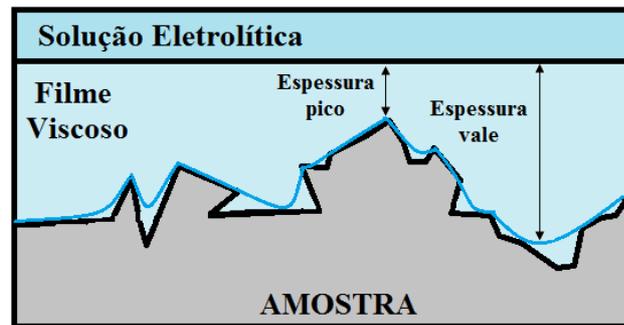


Figura 16: Diferença das espessuras do filme viscoso formado entre metal/eletrolito no pico e no vale da superfície da amostra que está sendo eletropolida. Quanto maior a espessura do filme, menor será o eletropolimento ocorrido naquela região devido a sua maior resistência elétrica [128].

Procedimentos do eletropolimento

Antes do procedimento de eletropolimento, as amostras de alumínio 99,997% foram limpas por 10 minutos em água deionizada fervente contendo sabão líquido. Posteriormente, essas amostras foram imersas em acetona por 30 minutos e lavadas com jato de água deionizada. Após secagem com nitrogênio, as amostras foram eletropolidas por 3 minutos em mistura de ácido perclórico e etanol (1:4, v:v) à 0°C e 15 V [131]. As amostras foram então lavadas com água deionizada, secas com nitrogênio e armazenadas em frascos pequenos.

4.2 ANODIZAÇÃO

A anodização é um processo de oxidação promovida na superfície do metal. Esse processo é realizado em uma célula eletroquímica de anodização, Figura 17 (A), em que a amostra de alumínio é conectada ao terminal positivo da fonte de tensão (ânodo) e o contato, que deve ser composto de material inerte ao eletrólito como platina, é conectado ao terminal negativo da fonte de alimentação (cátodo), sendo ambos imersos de maneira paralela no eletrólito. Quando a fonte é ligada, há a retirada de elétrons do ânodo, resultando em uma superfície positivamente carregada, sendo que esses íons positivos reagem com os íons negativos da solução eletrolítica. Já os íons positivos do eletrólito reagem com o excesso de

elétrons presentes no cátodo, esquema ilustrado na Figura 17 (B), ou seja, a diferença de potencial proporcionada pela fonte implica em reações de oxidação/redução que resultam na camada anódica na superfície do alumínio e que ocorrem simultaneamente no ânodo e no cátodo, caracterizando um equilíbrio entre cargas elétricas [20, 132].

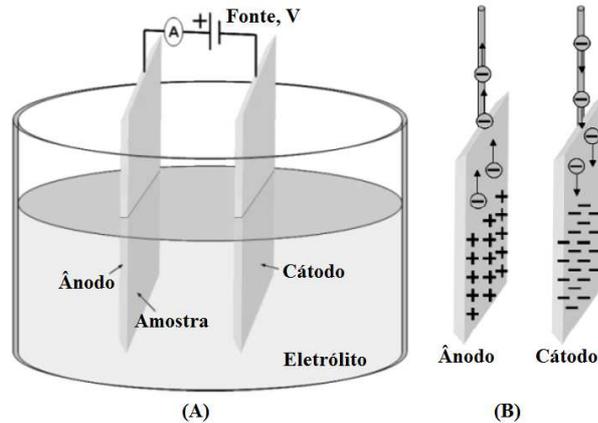


Figura 17: (A) Célula eletroquímica de anodização composta de eletrólito e uma fonte de alimentação. (B) Detalhe dos eletrodos e a movimentação das cargas [132].

Procedimentos da anodização

As amostras eletropolidas foram anodizadas no modo potenciostático em duas etapas em solução de ácido oxálico $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ à 15°C e 40 V . A primeira anodização teve duração de 2 horas e, após essa etapa, houve a remoção do óxido com solução de ácido fosfórico $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ e óxido crômico $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ à 60°C por 1 hora. Posteriormente, foi realizada a segunda anodização por 30 minutos, sendo seguida por uma etapa de alargamento de poros em ácido oxálico $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ à 15°C por mais 30 minutos [94]. As amostras anodizadas foram então lavadas com água deionizada, secas com jato de nitrogênio e armazenadas em frascos pequenos.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura utiliza feixe de elétrons com diâmetro pequeno para analisar a superfície da amostra. A interação do feixe incidente com a amostra produz elétrons e fótons que são transmitidos a um detector de tela catódica, resultando na micrografia. Basicamente, quando o feixe de elétrons incidente atinge a amostra, há a produção de elétrons secundários e de elétrons retroespalhados, que possuem energias diferentes e, portanto, são captados por detectores que operam em faixas de energias distintas. Os elétrons secundários

são gerados a partir da interação entre o elétron do feixe incidente e o átomo da amostra, possuindo assim baixa energia, menor do que 50 eV. Os elétrons retroespalhados são obtidos por colisão elástica entre os elétrons incidentes e as camadas mais superficiais da amostra e possuem maior energia, mas eles podem também ser gerados por espalhamento elástico dos elétrons incidentes com a amostra, possuindo energia próxima a dos elétrons secundários. Os sinais emitidos por esses elétrons secundários e/ou retroespalhados resultam na obtenção da imagem ^[133].

As micrografias foram obtidas no Centro Multidisciplinar para o Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC – LIEC) de São Carlos. O microscópio eletrônico de varredura utilizado era do modelo FEG Supra 35 da Zeiss e operou no modo de elétrons secundários. As micrografias foram analisadas com o programa de processamento de imagem de domínio público *ImageJ*®.

4.4 REFLECTÂNCIA

A espectroscopia de reflectância ocorre quando a radiação eletromagnética incidente é refletida pela superfície da amostra. Essa reflexão do feixe de luz pode ser especular ou difusa, sendo que a somatória dessas duas resulta na reflectância total. Na reflectância especular, Figura 18 (A), a radiação incide em uma superfície considerada lisa, ou seja, com irregularidades pequenas em relação ao comprimento de onda do feixe de luz incidente. Dessa forma, como os cumes e os vales presentes na superfície são pequenos em relação ao comprimento de onda incidente, a radiação será refletida pelos átomos superficiais da amostra como um único feixe de luz e os ângulos de incidência e de reflexão serão iguais. Na reflectância difusa, Figura 18 (B), a radiação incide em uma superfície irregular e os cumes e os vales presentes na superfície são grandes em relação ao comprimento de onda incidente, resultando em feixes de luz refletidos em direções aleatórias ^[134].

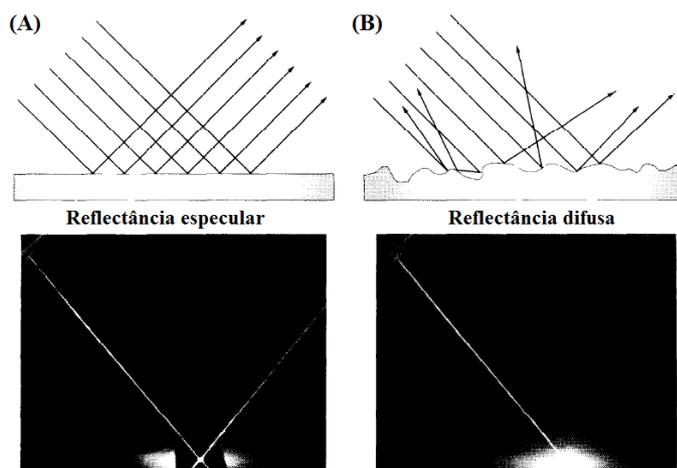


Figura 18: Reflectâncias (A) especular e (B) difusa ^[134].

As medidas de reflectância total foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu[®] UV-vis-NIR-3600 com esfera de integração LISR-3100, localizado na Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba. O intervalo do comprimento de onda foi de 240 nm a 700 nm, a largura da fenda do feixe de luz utilizada foi de 8 nm e o ângulo da esfera de integração foi de 7°, que é referente ao ângulo entre a radiação incidente e a refletida pela amostra.

4.5 FLUORESCÊNCIA

O processo da fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados por uma radiação eletromagnética e depois relaxam diretamente ao estado fundamental liberando energia como fótons é denominado de fluorescência. Basicamente, a medida ocorre excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção ou de excitação e medindo-se a emissão da energia na forma de luz a um comprimento de onda que normalmente apresenta um valor mais alto do que o comprimento de onda da luz absorvida, já que o fóton absorvido perde energia. A emissão na fluorescência é de curta duração, sendo que o tempo da conversão interna entre os estados eletrônicos é de 10^{-5} segundos a 10^{-10} segundos. Uma característica atrativa da fluorescência molecular é a sua sensibilidade intrínseca, pois a partir dos espectros de fluorescência, para algumas espécies sob condições controladas, é possível determinar a presença de uma única molécula ^[135]. Entretanto, um dos aspectos que limitam o processo de fluorescência é o de que muitos compostos não fluorescem porque suas estruturas apresentam alternativas para a relaxação não radiativa mais rápidas do que a emissão fluorescente como a piridina, o furano, o tiofeno e o pirrol ^[135].

Geralmente, a detecção da emissão fluorescente é realizada como no esquema da Figura 19. Nessa ilustração, a fonte excita a amostra resultando na radiação característica, que será detectada a um ângulo de 90° em relação à radiação incidente, a fim de se evitar a interferência desse feixe nas medidas ^[135].

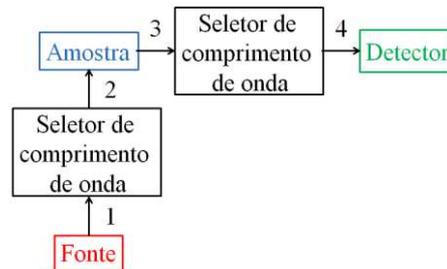


Figura 19: Esquema de medição de emissão fluorescente ^[135].

Essa técnica será utilizada paralelamente à de reflectância a fim de comparação dos resultados obtidos nessa dissertação, pois a AAP, como já mencionado, apresenta em seus espectros de fotoluminescência as oscilações resultantes do efeito de Fabry-Pérot, que serão interessantes na análise da resposta do biossensor que se pretende fabricar.

As medidas foram realizadas no espectrofluorímetro Shimadzu[®] RF-5301 com lâmpada de xenônio, localizado na Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba, e a posição da amostra de AAP durante as medidas encontra-se na Figura 20. O comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) utilizado durante as medidas foi de 280 nm, valor que corresponde ao λ_{ex} dos grupos triptofano da enzima GOx ^[136]. As janelas de excitação (EX) e de emissão (EM) durante os crescimentos dos filmes e a cinética de crescimento da GOx foram de 10 nm e 15 nm, respectivamente. Já para os testes dos biossensores, a EX foi de 5 nm e a EM foi de 15 nm. O ângulo da radiação incidente em relação à amostra foi de 0° , sendo que nessa configuração a radiação é emitida em ângulo rasante em relação à amostra de AAP, o que favorece as múltiplas reflexões nos poros e a obtenção das interferências de Fabry-Pérot ^[137].

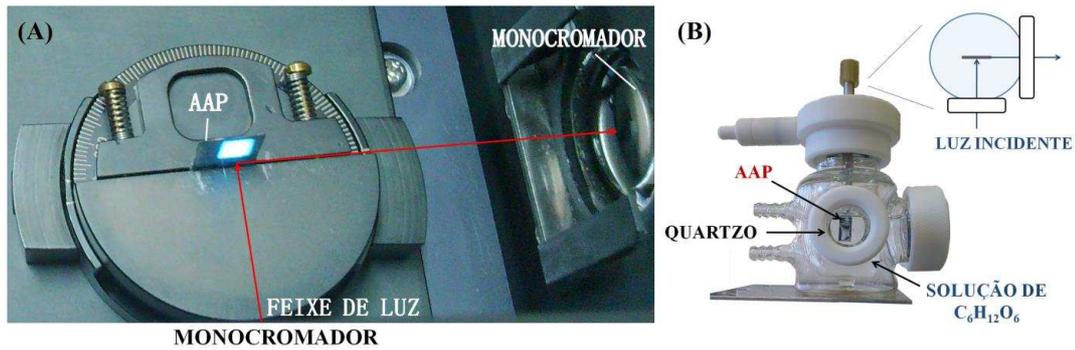


Figura 20: (A) Posição da amostra de AAP no espectrofluorímetro para a deposição do filme LbL e para a cinética de crescimento da GOx. (B) Célula utilizada para a realização dos testes do biossensor e sua posição em relação à luz incidente no equipamento.

4.6 FILMES *LAYER-by-LAYER* (LbL)

A técnica *Layer-by-Layer* é baseada em interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals [42, 43, 45, 46]. Durante o preparo de um filme LbL, Figura 21, um substrato sólido, previamente tratado para tornar sua superfície carregada, é imerso em uma solução contendo polieletrólito de carga oposta a dele. Uma camada então é adsorvida, promovendo a inversão da carga superficial do substrato em que está ocorrendo a deposição do filme. Em seguida, o substrato é mergulhado em uma solução de lavagem de mesmo pH do polieletrólito, a fim de remover o excesso de material depositado, formando uma monocamada com apenas o que foi fortemente adsorvido. Posteriormente, o substrato é submetido à secagem, que pode ser realizada com jato de nitrogênio ou à temperatura ambiente. Em seguida, o substrato com a monocamada é novamente imerso em solução contendo polieletrólito de carga oposta a dele, passa por uma solução de limpeza e é submetido à secagem. Tem-se então uma bicamada adsorvida e com uma carga superficial igual à original do substrato. Assim, repetindo-se o procedimento sucessivas vezes, é possível obter filmes LbL de espessura controlada de acordo com o número de bicamadas adsorvidas [138].

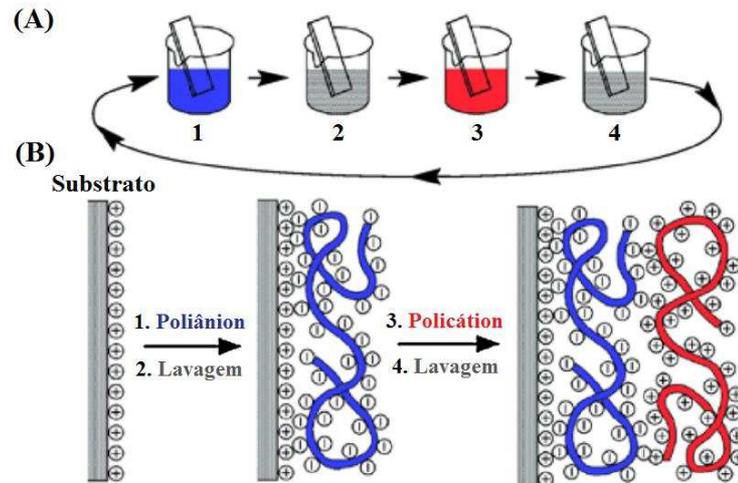


Figura 21: Esquema da técnica LbL. (A) Processo de adsorção da monocamada de poliânion seguido de lavagem do substrato. (B) Adsorção de uma camada de policação promovendo a formação de uma bicamada [46].

Procedimentos do preparo do filme LbL

A AAP foi utilizada como plataforma para o preparo do filme LbL e a deposição dos filmes foi acompanhada por fotoluminescência ou reflectância total e foi realizada manualmente. Dois conjuntos de concentrações das soluções precursoras do filme foram utilizados, descritas na Tabela 2. Os tempos de adsorção para cada solução foram de 5 minutos para a PAH, de 5 minutos para o PVS e de 10 minutos para a GOx antes da cinética de crescimento e de 6 minutos depois da realização da cinética. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de sódio $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,3, sendo que esse tampão também foi utilizado como solução de lavagem durante a fabricação do filme LbL, onde a AAP permanecia imersa por 30 segundos após a deposição da PAH, do PVS ou da GOx.

Tabela 2: Conjunto das concentrações das soluções precursoras dos filmes LbL.

Conjunto	PAH	PVS	GOx
Concentrações 1	1 mg.mL^{-1}	5 mg.mL^{-1}	$0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$
Concentrações 2	$0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$	$0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$	$0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$

Antes do crescimento das bicamadas de PAH/GOx, um colchão de PAH/PVS foi depositada com o intuito de minimizar a influência do substrato na enzima e de proteger a estrutura da mesma [139]. Primeiramente, a AAP foi submersa em solução catiônica de PAH, lavada em tampão e então seca com nitrogênio. Posteriormente, a AAP contendo uma camada

de PAH foi levada à solução de PVS, lavada em tampão e seca novamente. Foi realizada uma medida óptica de reflectância total ou fotoluminescência a cada camada depositada. A Figura 22 ilustra o esquema de preparo do colchão.

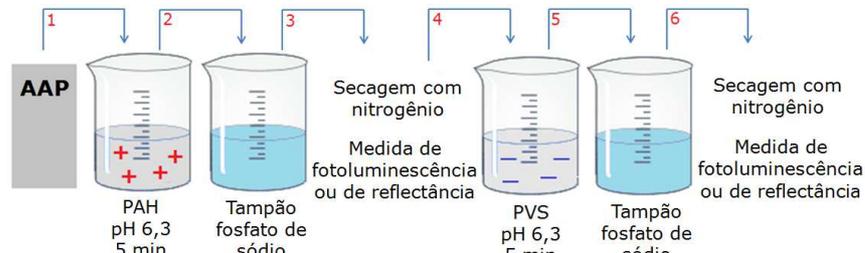


Figura 22: Esquema de deposição do colchão de PAH/PVS em AAP.

Para a deposição do filme LbL de PAH/GOx, o substrato contendo o colchão foi submerso em solução de PAH, lavado em tampão e seco com nitrogênio. Em seguida, a amostra de AAP com uma nova camada de PAH adsorvida foi imersa em solução aniônica da enzima GOx, lavada em tampão e seca. Uma medida óptica de reflectância total ou fotoluminescência foi realizada para cada camada depositada. O esquema da Figura 23 representa o preparo do filme de PAH e da enzima GOx. O esquema da Figura 24 ilustra a estrutura desse filme LbL em um nanoporo da AAP.

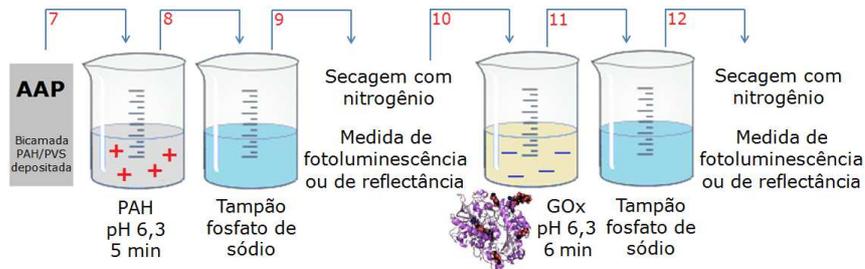


Figura 23: Esquema da deposição do filme de PAH/GOx em AAP.

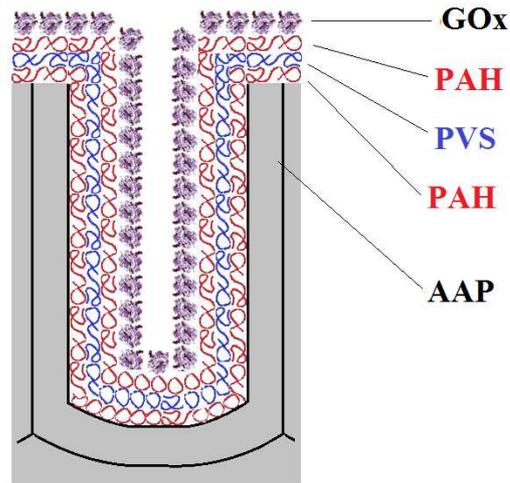


Figura 24: Esquema da estrutura do filme LbL em alumina anódica poro.

4.7 TESTES DO BIOSSENSOR

Todos os testes foram realizados por medidas de fotoluminescência. O primeiro teste, Figura 25, foi realizado com a AAP contendo o filme de uma bicamada de PAH/GOx. As medidas de fotoluminescência foram realizadas com o substrato imerso nas soluções de glicose de concentrações 10^{-5} mol.L⁻¹, 10^{-4} mol.L⁻¹, 10^{-3} mol.L⁻¹, 10^{-2} mol.L⁻¹, 10^{-1} mol.L⁻¹, 1 mol.L⁻¹ e na solução tampão fosfato de sódio, pH 6,3. As soluções de glicose também foram preparadas no tampão. Esse primeiro teste foi realizado com soluções tampão de concentrações diferentes a fim de verificar se a concentração dessa solução iria interferir na resposta do sensor. As concentrações das soluções tampão averiguadas foram de 10^{-2} mol.L⁻¹ e de 10^{-3} mol.L⁻¹. Dessa forma, foi verificado que o resultado do primeiro teste utilizando a solução tampão de 10^{-3} mol.L⁻¹ foi melhor para ser analisado. Assim, essa solução foi utilizada em todas as etapas seguintes do projeto.

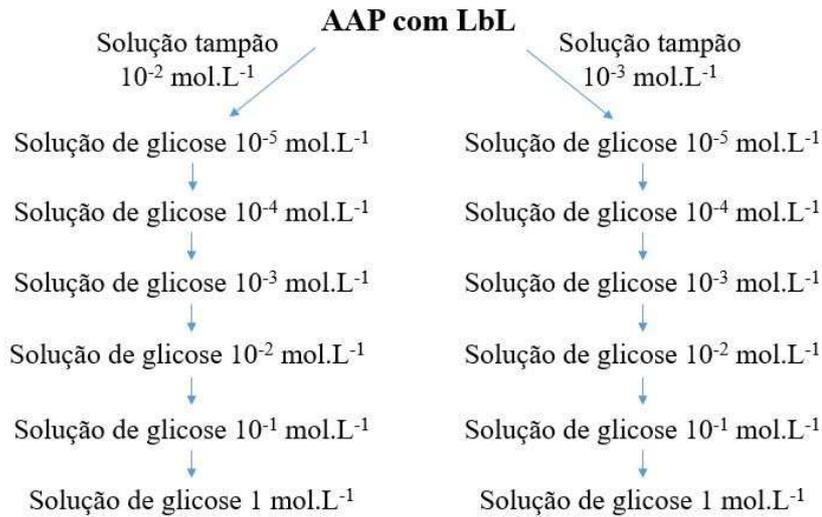


Figura 25: Esquema do primeiro teste do sensor de AAP modificado por LbL.

O segundo teste, Figura 26, foi realizado imergindo a AAP sem o filme LbL depositado em soluções de glicose de concentrações 10^{-4} mol.L⁻¹, 10^{-3} mol.L⁻¹, 10^{-2} mol.L⁻¹, 10^{-1} mol.L⁻¹, 1 mol.L⁻¹ e na solução tampão fosfato de sódio 10^{-3} mol.L⁻¹, pH 6,3. O comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) dos dois primeiros testes foi de 280 nm, que corresponde ao λ_{ex} do grupo triptofanos da enzima GOx [136].

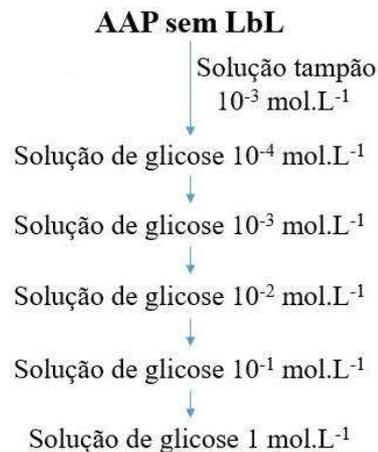


Figura 26: Esquema do segundo teste do sensor de AAP sem modificação por LbL.

Posteriormente, três novos testes foram realizados com AAP sem filme LbL a fim de se verificar a resposta em novas concentrações por análise multivariada. Cada substrato foi imergido em soluções de glicose de concentrações presentes na Tabela 3. Em seguida, três outros testes foram realizados com AAP modificada por LbL. Os biossensores foram imersos em soluções de glicose de concentrações organizadas na Tabela 4. Todas as soluções de glicose

foram preparadas com solução tampão fosfato de sódio 10^{-3} mol.L⁻¹, pH 6,3. Para as duas triplicatas realizadas foram utilizados os comprimentos de onda de excitação de 280 nm e de 320 nm em todas as medidas. O comprimento de onda de excitação de 320 nm foi utilizado, pois nele há a fotoluminescência da AAP [36]. A Figura 27 ilustra um esquema das triplicatas realizadas.

Tabela 3: Concentrações das soluções de glicose utilizadas no teste do sensor da AAP sem modificação por LbL.

Concentrações da solução de glicose (mol.L ⁻¹)	
	0,09
	0,10
	0,30
	0,50
	0,70
	0,90
	1,00
	1,10

Tabela 4: Concentrações das soluções de glicose utilizadas no teste do sensor da AAP modificada por LbL.

Concentrações da solução de glicose (mol.L ⁻¹)	
0,009	0,300
0,010	0,500
0,030	0,700
0,050	0,900
0,070	1,000
0,090	1,100
0,100	-----

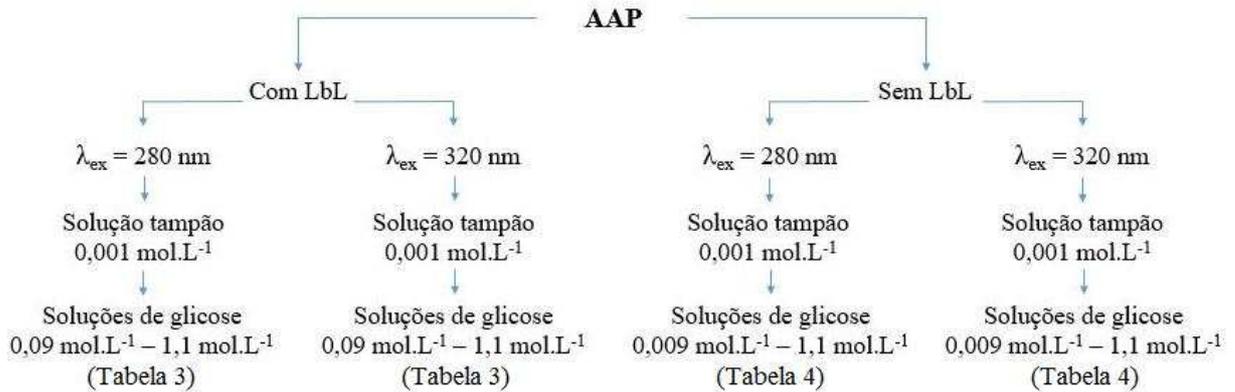


Figura 27: Esquema das duas triplicatas dos testes de sensores de AAP com e sem modificação por LbL.

4.8 ANÁLISE MULTIVARIADA

O conjunto de dados obtido a partir dos testes dos sensores foi primeiramente submetido à análise exploratória para observação do comportamento dos espectros em função da variação da concentração de glicose, quando submetidos a uma técnica de fatoração como a PCA. A intenção dessa etapa é avaliar, preliminar e indiretamente, a possibilidade de determinação da glicose por PLS investigando se os escores dos espectros seguem alguma tendência em função da variação da concentração de glicose na PCA.

Os dados foram analisados na sua forma original ou pré-processados por centralização pela média. Nesse pré-processamento, o valor médio de cada variável é determinado e então subtraído de cada variável correspondente. Esse tipo de procedimento minimiza o efeito negativo causado pela presença de ruídos, favorecendo a análise ^[101]. Diferentes transformações dos dados também foram utilizadas com objetivo de ressaltar características subjacentes aos espectros que possam levar a melhor identificação de tendências de organização dos escores em função da concentração. São elas:

- Transformação por derivadas: soluciona problemas relacionados a desvios lineares da linha de base. A primeira derivada corrige deslocamentos dos espectros que ocorrem em quantidades constantes. A segunda derivada corrige a inclinação da linha de base. Entretanto, alguns algoritmos utilizados para eliminar esses problemas interferem nos resultados ^[99, 101].

- Correção de espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês “multiplicative scatter correction”): ferramenta utilizada na correção de problemas causados por espalhamento de luz. Uma vantagem desse procedimento é o fato do espectro obtido ser semelhante ao original, o que favorece a interpretação ^[101].

- Variação normal padrão (SNV, do inglês “standard normal variate”): também minimiza problemas com dispersão de radiação [99].

Na etapa de calibração multivariada por PLS, os modelos obtidos foram comparados segundo os parâmetros de desempenho analítico descritos a seguir.

- Número de fatores: está relacionado com a complexidade do modelo. Quanto maior a quantidade de fatores necessários para descrever um modelo, mais complexo é esse modelo. Portanto, bons modelos possuem número de fatores menor, sendo mais simples [102].

- Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio de Previsão (RMSEP, do inglês “root mean square error of prediction”): é uma estimativa direta do erro de previsão expresso na unidade de medida original. O RMSEP, então, se assemelha a um desvio-padrão e, portanto, bons modelos possuem RMSEP de valores baixos [101, 140].

- Coeficiente de correlação linear (R): indica o nível de correlação entre duas variáveis analisadas. No caso dos modelos PLS, uma variável é o valor de referência da concentração de glicose e a outra é o valor previsto pelo modelo. O valor de R varia de -1 a +1, sendo que quanto mais próximo desses valores, maior é a correlação entre as variáveis, e quanto mais próximo de zero, menor é essa correlação. Assim, o melhor modelo tem valor de R próximo a +1 ou a -1 [141].

Todos os cálculos foram realizados empregando o programa Pirouette 4.0 (Infometrix, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No preparo das amostras de AAP foram obtidas curvas de anodização como a ilustrada na Figura 28, que corresponde a uma amostra anodizada no modo potenciostático em duas etapas, a primeira de duas horas e a segunda de trinta minutos. Analisando a curva, foi verificado que no início da anodização houve (i) uma queda da densidade de corrente indicando o crescimento de uma camada de óxido de alumínio compacta. Essa fase foi então seguida do (ii) aumento da densidade de corrente devido ao início da formação dos poros. Esse comportamento da curva de anodização potenciostática está de acordo com o descrito no trabalho de Zaraska *et al.* [86]. Na segunda etapa de anodização a densidade de corrente máxima apresentou um valor menor do que na primeira etapa de anodização. De acordo com Montero-Moreno *et al.* [142], isto pode ser explicado pois na primeira etapa há a necessidade de mais corrente para o início da nucleação, e na segunda já há uma nanotextura relacionada à base dos poros, sendo então toda corrente utilizada para o crescimento dos mesmos. Foram realizadas em torno de 33 anodizações, indicando que as amostras de AAP obtidas estavam morfologicamente semelhantes, pois as curvas de anodização foram similares.

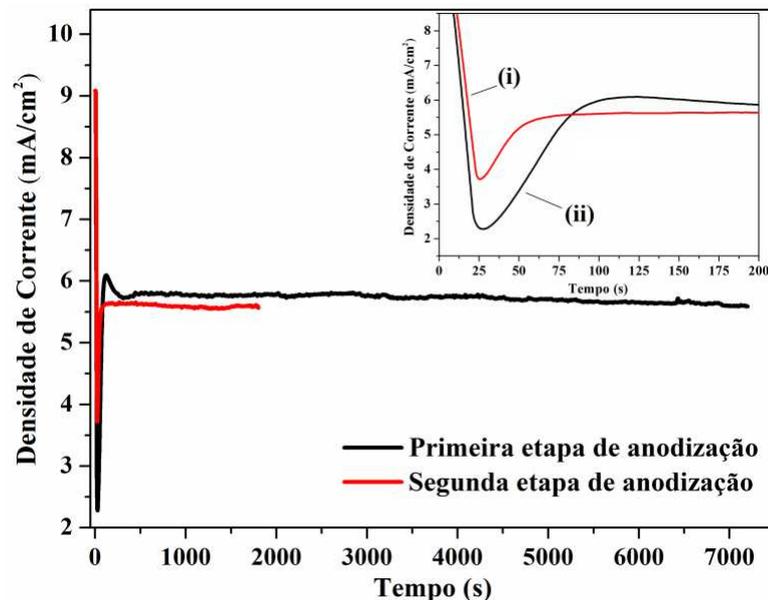


Figura 28: Curvas de duas etapas de anodização potenciostática.

A análise morfológica da AAP foi realizada a partir da microscopia eletrônica de varredura topológica e transversal, Figura 29 (A) e (B). A partir dessas ilustrações, foi possível estimar o diâmetro médio dos poros de $(47,91 \pm 0,07)$ nm, sendo que $\pm 0,07$ nm corresponde ao desvio-padrão da média dos poros. A determinação desse diâmetro é importante porque a

máxima estabilização da GOx pode ser alcançada com a sua adsorção em locais esféricos com diâmetros de 2 a 6 vezes maiores do que o da enzima, e sabe-se que a dimensão da GOx é de cerca de (7,0 x 5,5 x 8,0) nm³ [143]. Dessa forma, o diâmetro do poro obtido foi adequado para a adsorção da molécula. Além disso, foi verificado que houve a formação de poros estruturados e com regularidade homogênea.

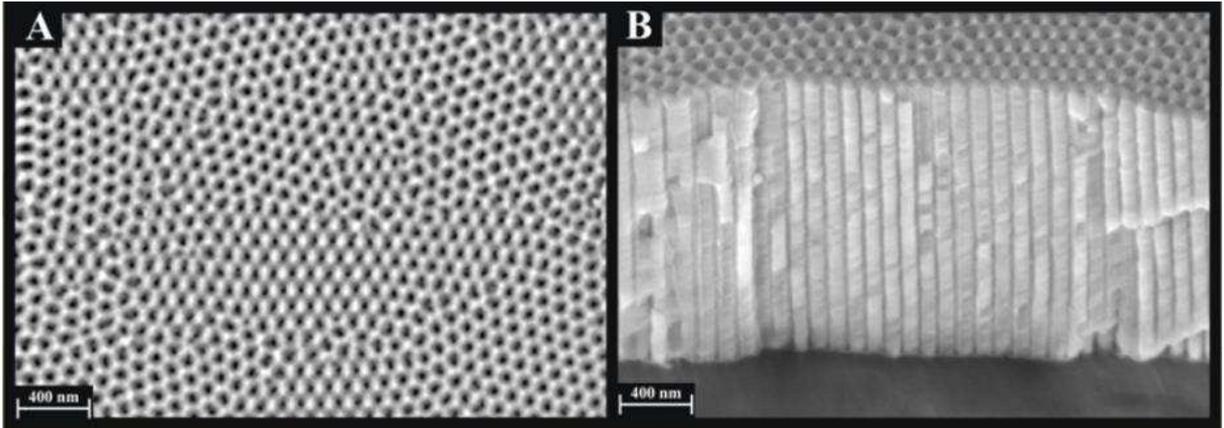


Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura (A) topológica e (B) transversal de um alumínio 99,997% de pureza anodizado em duas etapas à 15°C, 40 V. A primeira etapa com duração de 2 horas e a segunda de 30 minutos, sendo seguida de 30 minutos de alargamento de poros [194]. (Escala: 400 nm).

Com as amostras de AAP preparadas, filmes LbL contendo 10 bicamadas de PAH/GOx foram depositados. Durante a deposição do filme LbL acompanhada por fotoluminescência, o comprimento de onda de excitação foi de 280 nm, valor que corresponde ao λ_{ex} do grupo triptofano da enzima GOx [136]. As concentrações das soluções precursoras do filme LbL foram de 1 mg.mL⁻¹ de PAH, de 5 mg.mL⁻¹ de PVS e de 0,5 mg.mL⁻¹ de GOx (Tabela 2). Analisando os espectros obtidos, Figura 30 (A) e (B), foi possível verificar que houve comportamento desordenado da intensidade das curvas à medida que as bicamadas de PAH/GOx foram depositadas. Era esperado que no espectro de fotoluminescência a intensidade aumentasse com a deposição da GOx, pois essa enzima é fotoluminescente devido à presença dos grupos triptofanos em sua estrutura [136]. Já no espectro de reflectância total, esperava-se que a intensidade diminuísse, pois com a deposição das camadas, há um aumento da absorção do feixe de luz e, conseqüentemente, menos radiação é refletida. Como o comportamento das curvas foi aleatório, pode-se considerar que as camadas não adsorveram de maneira eficaz, comprometendo o crescimento do filme.

Verifica-se também na Figura 30 (A) que a curvas referentes à amostra de AAP e às primeiras camadas de polieletrólitos apresentam comportamento semelhante a uma banda em aproximadamente 360 nm. Como a curva da AAP também apresentou esse comportamento,

acredita-se que ele foi devido a alguma característica da amostra anodizada, que foi sendo suavizada à medida que as bicamadas foram depositadas.

Nota-se também que, com a deposição das camadas, as interferências de Fabry-Pérot diminuam de amplitude até que cessavam por completo. Isto pode ser devido ao preenchimento dos poros de forma a impossibilitar as reflexões construtivas e destrutivas que resultam nesse fenômeno de interferência. A ideia de preenchimento dos poros foi trabalhada por Lazzara *et al.* [144] que depositaram polieletrólitos e proteínas através da técnica LbL em membranas de AAP. Eles verificaram que à medida que as bicamadas eram depositadas, a própria geometria cilíndrica do poro se tornava uma barreira para o crescimento do filme LbL, sendo que quando o diâmetro do poro alcançava valores de 20 a 35 nm, a deposição já não mais ocorria. Dessa forma, é viável pensar que os poros tenham alcançado diâmetros em que a deposição de PAH/GOx já não mais ocorria da forma esperada, fazendo com que as oscilações de Fabry-Pérot se extinguissem, sendo que as últimas franjas podem ser observadas na primeira bicamada de PAH/GOx e lembrando que o diâmetro dos poros da AAP utilizada como substrato para o crescimento do filme foi de $(47,91 \pm 0,07)$ nm, valor relativamente próximo ao do limite apresentado por Lazzara *et al.* [144].

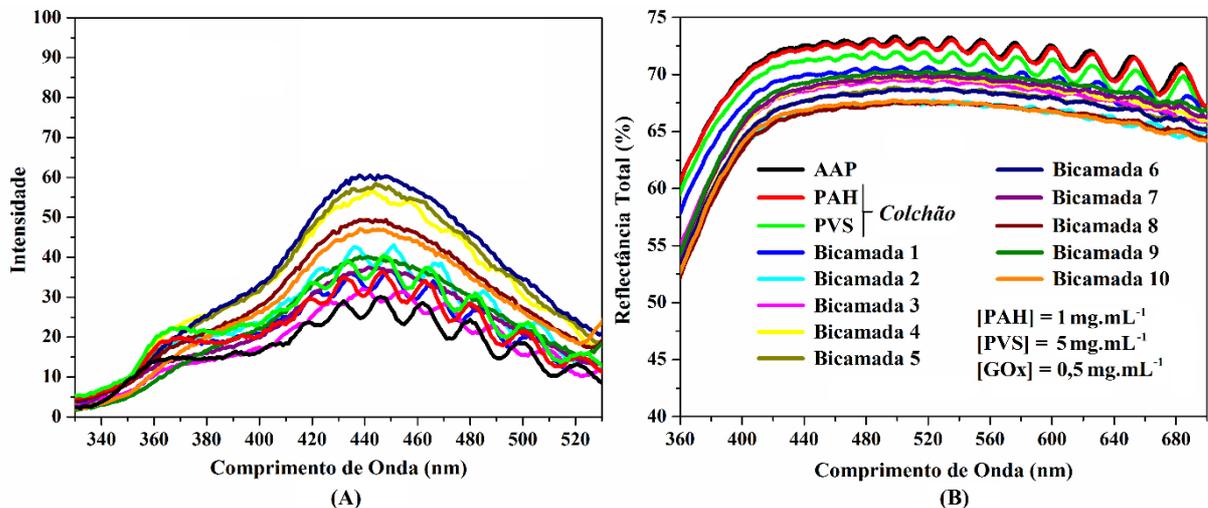


Figura 30: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total de filmes LbL contendo 10 bicamadas de PAH/GOx.

Assim, para contornar esses problemas de crescimento do filme e de obstrução dos poros, as soluções precursoras foram diluídas às concentrações de $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$ de PAH, $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ de PVS e $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ de GOx (Tabela 2), e os filmes foram depositados até a primeira bicamada de PAH/GOx. Essas concentrações diluídas foram determinadas através de experimento com a solução da GOx, em que foram realizados espectros de fotoluminescência

de várias soluções da enzima com concentrações diluídas a partir da de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. A concentração de $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ de GOx foi a definida pois, entre as outras concentrações utilizadas no teste, ela foi a única que não extrapolou o máximo de intensidade obtido pelo espectrofluorímetro. Já as soluções de PAH e de PVS foram proporcionalmente diluídas em relação a nova concentração da solução da enzima. O crescimento dos filmes LbL foi acompanhado por fotoluminescência, Figura 31 (A), e por reflectância total, Figura 31 (B). Analisando os espectros obtidos, foram verificados o crescimento ordenado das camadas de PAH, PVS e GOx, e a manutenção das amplitudes das interferências de Fabry-Pérot. Dessa forma, a próxima etapa do trabalho foi um teste com essa AAP modificada por LbL em solução de glicose a fim de se verificar se esse sistema poderia ser utilizado como biossensor.

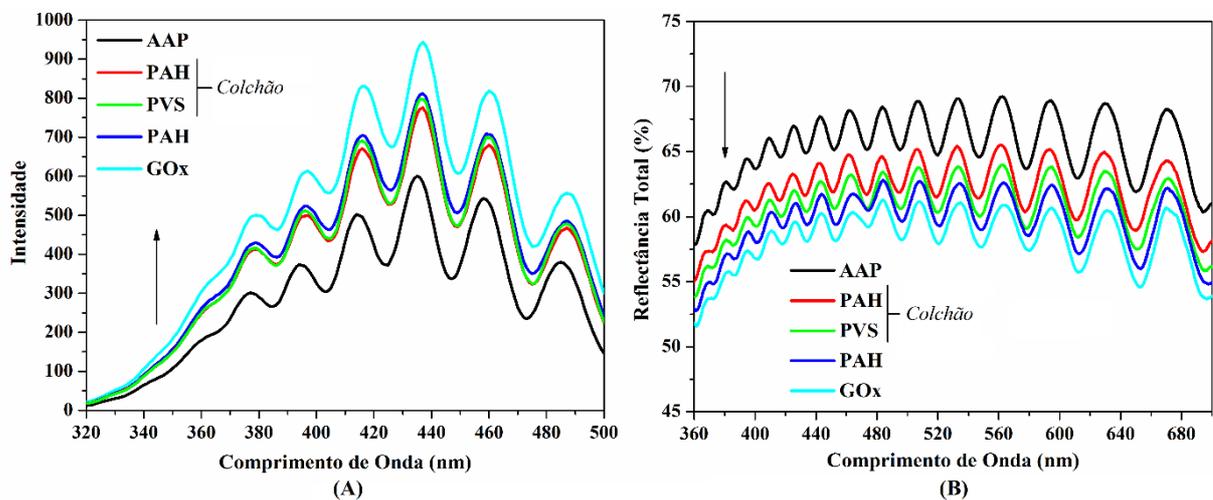


Figura 31: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total de filmes LbL contendo uma quadricamada de PAH/PVS/PAH/GOx.

Como foi possível acompanhar a deposição do filme LbL por fotoluminescência e por reflectância total, essas duas técnicas ópticas foram utilizadas como métodos transdutores para o teste do biossensor. Esse teste foi realizado imergindo a amostra de AAP, modificada com o filme LbL, em solução de $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose. O intuito desse teste era verificar mudanças nas frequências e nas amplitudes das oscilações de Fabry-Pérot, o que indica alteração no índice de refração da AAP. Analisando o espectro de fotoluminescência obtido com o teste, Figura 32 (A), foi possível observar que houve um aumento nas amplitudes e um deslocamento das oscilações para menores comprimentos de onda. Já no espectro de reflectância, Figura 32 (B), foi possível verificar que houve uma diminuição na amplitude das interferências de Fabry-Pérot e que não houve deslocamento das oscilações em relação ao comprimento de onda. Dessa forma, pode-se considerar que a técnica de fotoluminescência foi um método de transdução

mais eficaz para o teste do biossensor. Assim, as próximas medidas se concentraram apenas no uso dessa técnica para a fabricação do biossensor óptico de glicose.

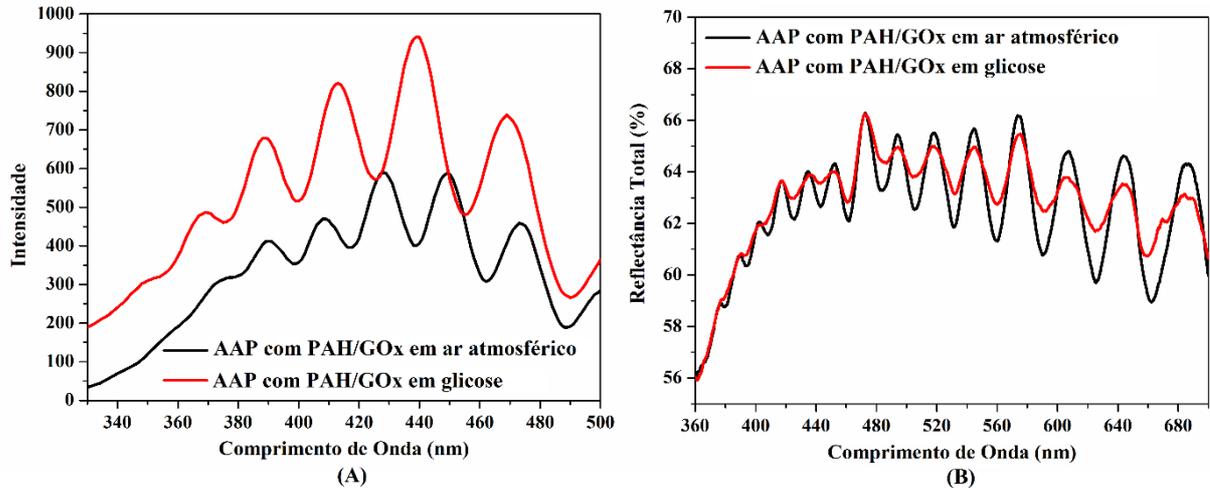


Figura 32: Espectros de (A) fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm e de (B) reflectância total referentes ao teste do biossensor em solução $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose.

Além dessas análises referentes às técnicas espectroscópicas, um teste para analisar o tempo de resposta do biossensor foi realizado. Nesse teste, a AAP com o filme de GOx foi submersa em solução de glicose $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ e o tempo de imersão foi cronometrado por 600 segundos. Verifica-se pela Figura 33 que houve deslocamento imediato dos espectros em relação ao comprimento de onda após o contato do biossensor com a glicose, caracterizando uma resposta rápida do sensor.

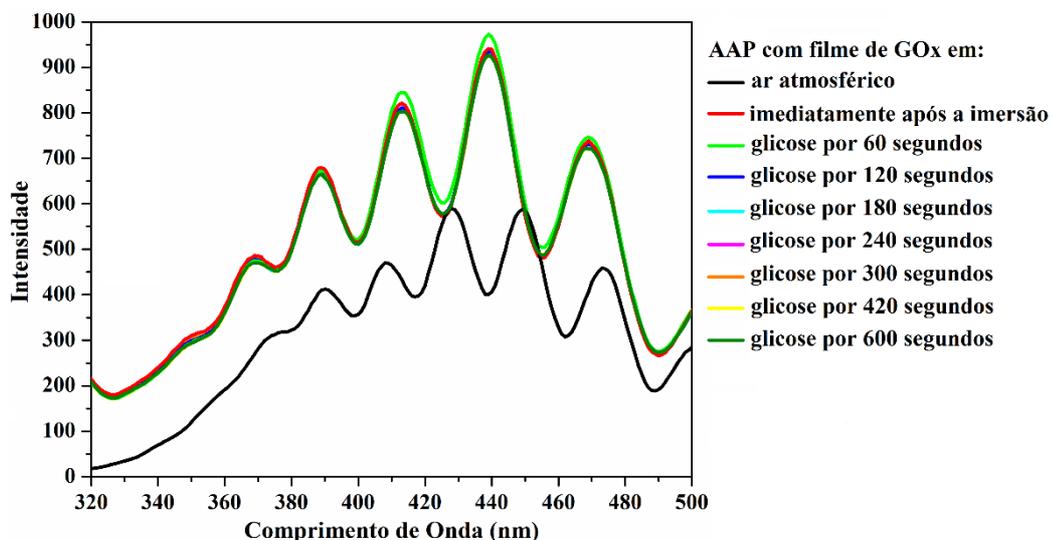


Figura 33: Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm referente ao teste do tempo de resposta do biossensor em solução $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicose.

A cinética de crescimento da solução de GOx foi realizada antes de se iniciar a deposição do filme LbL. Essa cinética é realizada a fim de se verificar o tempo necessário de imersão do substrato de AAP em solução de GOx para se ter a máxima adsorção da enzima e a mesma quantidade de GOx depositada em todos os filmes para controle de espessura. A partir do espectro de fotoluminescência, Figura 34, foi possível verificar o aumento da intensidade em um determinado comprimento de onda, sendo escolhido o valor de 440 nm, que correspondeu à intensidade máxima do espectro. Dessa forma, o gráfico em destaque na Figura 34 foi construído a partir dos valores da intensidade em 440 nm e dos tempos de imersão da AAP na solução de GOx. Analisando a Figura 34, é possível observar que, após 340 segundos, a deposição da enzima deixa de ocorrer, sendo este então o tempo aproximado de imersão da AAP em solução de GOx durante a fabricação do filme LbL. A partir do espectro de fotoluminescência é possível ressaltar também que não houve a obstrução dos poros com a nova concentração da solução da enzima, sendo que as oscilações de Fabry-Pérot permaneceram nítidas.

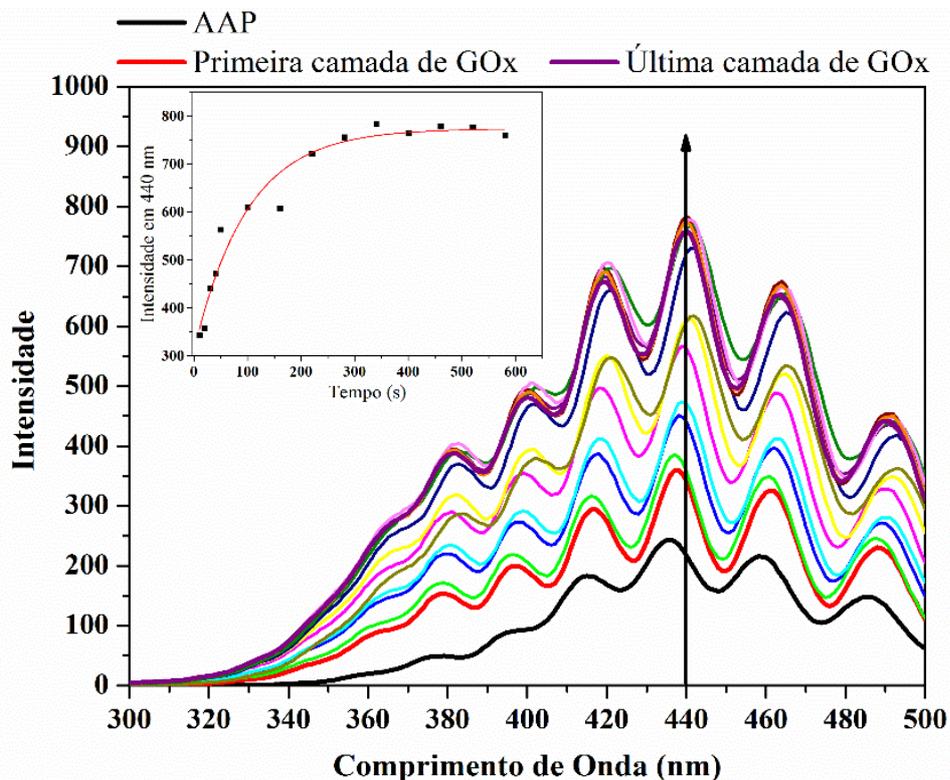


Figura 34: Espectro de fotoluminescência obtido durante a cinética de crescimento da solução de GOx (λ_{ex} de 280 nm).

Após a cinética de crescimento da solução de GOx, três filmes LbL foram preparados e os valores de desvio-padrão de cada camada foram determinados, Figura 35 (A). Esses desvios-

padrão são referentes à diferença entre a intensidade da camada de polieletrólito ou enzima depositada e a intensidade da AAP em 440 nm, mesmo comprimento de onda utilizado na análise da cinética de deposição da GOx. Essas diferenças de intensidades foram calculadas como em destaque na Figura 35 (B), subtraindo a intensidade da AAP em 440 nm da intensidade de cada camada do filme LbL em 440 nm como a da PAH do colchão ($I_{PAH1} - I_{AAP}$), do PVS ($I_{PVS} - I_{AAP}$), da PAH ($I_{PAH2} - I_{AAP}$) e da GOx ($I_{GOx} - I_{AAP}$). Dessa forma, as diferenças de intensidades foram utilizadas a fim de se verificar se as mesmas quantidades de PAH, PVS e GOx foram depositadas nos três filmes fabricados. Foi verificado que os valores de desvio-padrão referentes ao PVS e à PAH2 foram grandes, o que pode ser explicado talvez por uma deposição não homogênea da camada de PVS e, conseqüentemente, da de PAH2 no substrato poroso ou por alguma mudança na posição da amostra de AAP durante o crescimento do filme. Além dessas explicações, essa diferença de adsorção pode ser devida às poucas camadas depositadas na fabricação do filme LbL, sendo que as forças de interação entre as primeiras camadas e o substrato são diferentes das camadas posteriores. No entanto, a possibilidade da deposição do filme LbL em AAP foi verificada. Assim, duas dessas amostras modificadas por LbL foram utilizadas para o teste do sensor, sendo seus resultados analisados de forma individual como descrito a seguir.

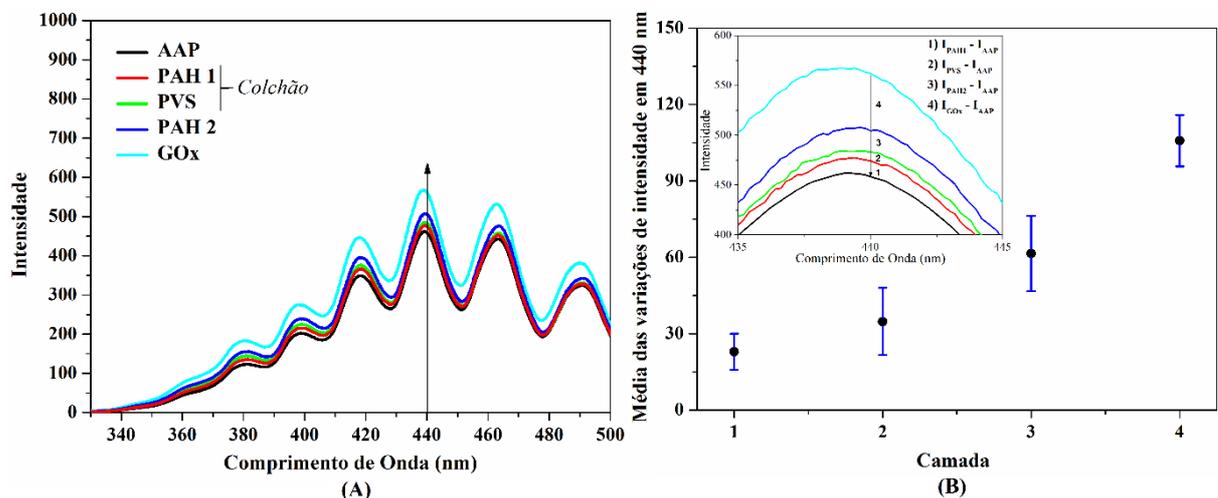


Figura 35: Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm de (A) filme LbL de PAH/PVS/PAH/GOx. Em (B), há as médias, entre esse filme e outros dois, das variações entre as intensidades de uma camada do filme LbL com a de AAP ($I_{PAH1} - I_{AAP}$, $I_{PVS} - I_{AAP}$, $I_{PAH2} - I_{AAP}$ e $I_{GOx} - I_{AAP}$).

Com os filmes LbL depositados, dois testes dos biossensores foram realizados variando-se as concentrações das soluções de glicose em 10^{-5} mol.L⁻¹, 10^{-4} mol.L⁻¹, 10^{-3} mol.L⁻¹, 10^{-2} mol.L⁻¹, 10^{-1} mol.L⁻¹ e 1 mol.L⁻¹. No primeiro teste, Figura 36 (A), a concentração da solução tampão utilizada no preparo das soluções de glicose foi de 10^{-2} mol.L⁻¹. No segundo teste,

Figura 36 (B), a concentração da solução tampão fosfato de sódio foi de 10^{-3} mol.L⁻¹. Essas duas concentrações de tampão foram utilizadas com o intuito de verificar a influência dessa solução no teste. Analisando a Figura 36, foi possível verificar nos dois casos que, quando a AAP estava em solução de glicose 1 mol.L⁻¹, houve o deslocamento das oscilações para menores comprimentos de onda, comportamento que também foi observado de forma sutil quando utilizada a solução de 10^{-1} mol.L⁻¹ de glicose. Esses deslocamentos podem ser vistos nos detalhes das Figura 36 (C) e (D). Esse deslocamento pode ser analisado como a resposta do biossensor óptico, indicando mudança no índice de refração da AAP em função da presença da glicose [30-32, 37, 95-96]. Em relação à solução tampão fosfato de sódio, foi possível verificar que, quando utilizada a de concentração 10^{-3} mol.L⁻¹, as mudanças nas oscilações de Fabry-Pérot da AAP em solução de glicose 10^{-1} mol.L⁻¹ foram mais nítidas do que quando utilizada a solução tampão 10^{-2} mol.L⁻¹, indicando uma possível interferência do tampão mais concentrado durante as medidas do teste. Dessa forma, os testes seguintes foram realizados utilizando-se a solução tampão de 10^{-3} mol.L⁻¹ que apresentou melhores resultados para análise.

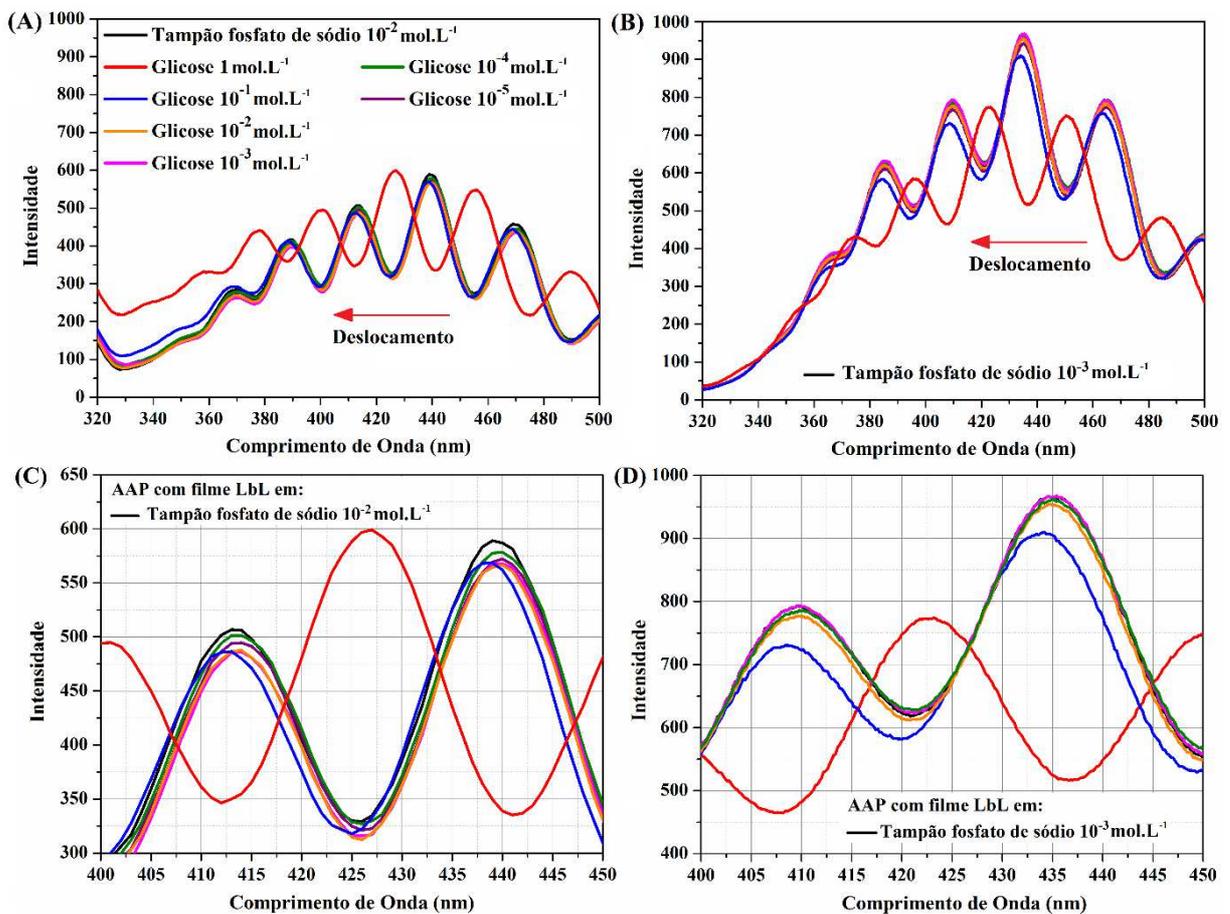


Figura 36: Espectros de fotoluminescência, λ_{ex} de 280 nm, dos testes com várias concentrações de solução de glicose preparadas com soluções tampão fosfato de sódio de (A) 10^{-2} mol.L⁻¹ e (B) 10^{-3} mol.L⁻¹. Detalhes das interferências de Fabry-Pérot dos testes dos biossensores em soluções tampão fosfato de sódio de (C) 10^{-2} mol.L⁻¹ e (D) 10^{-3} mol.L⁻¹.

Como foi verificada a resposta da AAP modificada por LbL à presença de glicose, a próxima etapa descrita teve o intuito de analisar a influência do filme LbL na detecção de glicose, sendo realizado um teste do sensor com uma amostra de AAP sem o filme de PAH/PVS/PAH/GOx depositado. As concentrações das soluções de glicose foram 10^{-4} mol.L⁻¹, 10^{-3} mol.L⁻¹, 10^{-2} mol.L⁻¹, 10^{-1} mol.L⁻¹ e 1 mol.L⁻¹. Analisando a Figura 37 (A), foi possível observar o mesmo comportamento verificado na Figura 36, sendo que as oscilações de Fabry-Pérot deslocaram para menores comprimentos de onda quando a AAP estava em contato com as soluções de glicose 10^{-1} mol.L⁻¹ e 1 mol.L⁻¹. Esse deslocamento pode ser visto em detalhe na Figura 37 (B).

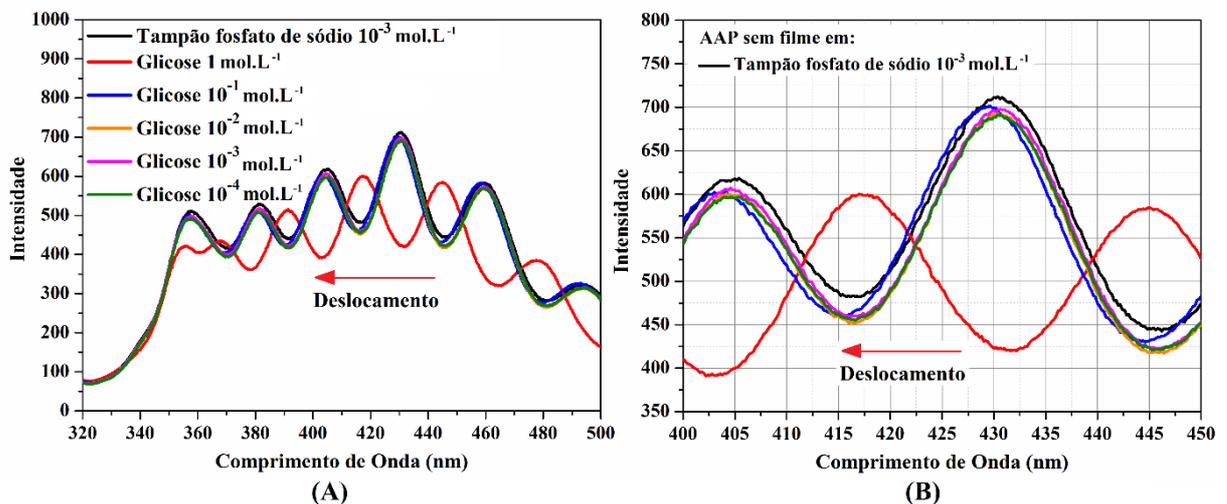


Figura 37: (A) Espectro de fotoluminescência com λ_{ex} de 280 nm do teste da amostra de AAP sem o filme de PAH/PVS/PAH/GOx em várias soluções de glicose. (B) Detalhe das interferências de Fabry-Pérot da AAP na presença de glicose.

Para os testes realizados utilizando a AAP com o filme LbL, Figura 36, e utilizando a AAP sem modificação superficial, Figura 37, foi possível observar que, para os resultados analisados qualitativamente pelos deslocamentos dos espectros, a concentração mínima detectada foi de 10^{-1} mol.L⁻¹. Essa mesma concentração mínima detectada tanto com a AAP com modificação quanto com a AAP sem filme LbL pode ser entendida quando se estuda a reação enzimática que envolve a GOx e a glicose. Nessa reação, há a oxidação da β -D-glicose para D-glucono- δ -lactone (GDL) através de O₂ e a simultânea produção de peróxido de hidrogênio, sendo que a GDL hidrolisa espontaneamente para ácido glucônico [64]. Analisando essa reação, tem-se que a utilização da GOx para a fabricação de biossensores amperométricos é viável e amplamente utilizada devido ao peróxido de hidrogênio liberado que é eletroativo [64, 145]. Entretanto, quando a enzima entra em contato com a glicose não deve haver mudanças

significativas no índice de refração que possam ser verificadas apenas com a análise qualitativa dos deslocamentos dos espectros. Assim, para melhor verificar a eficácia do sensor quando modificado por LbL, técnicas quimiométricas de análise também foram utilizadas como uma nova forma de avaliação das respostas dos sensores, visando empregar o máximo possível de informação contida nos espectros de fotoluminescência. Primeiramente, uma análise de componentes principais foi realizada em espectros sem nenhum tipo de pré-processamento ou transformação dos dados. Foram analisados os espectros apresentados na Figura 37 a fim de avaliar se o uso de componentes principais (PCs) poderia indicar quão similares ou dissimilares esses espectros eram entre si e, se houvesse diferenças, se estas poderiam estar associadas à mudança de concentração. Pela observação do gráfico de escores (não mostrado aqui), verificou-se que apenas o espectro da concentração $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ era significativamente diferente dos outros, e que esses últimos eram semelhantes entre si. Foi concluído então que a análise PCA dos espectros na sua forma original não trouxe nenhuma informação além da observada nos dados originais.

Em seguida foi realizada uma PCA nos dados pré-processados pela média após transformação pelo algoritmo MSC, que corrige efeitos de espalhamento de luz que podem resultar em variações nos espectros^[101]. A Figura 38 ilustra o efeito causado pela transformação com MSC no espectro referente ao teste do sensor de AAP sem modificação por LbL. A Figura 38 (A) é o espectro original do teste e a Figura 38 (B) é o espectro após a aplicação da MSC, em que foi visível principalmente o deslocamento no eixo x da curva referente à AAP em solução de glicose 1 mol.L^{-1} . Foi possível verificar pela Figura 39 que a centralização pela média após o MSC deslocou o centroide da matriz de dados à origem e ressaltou pequenas diferenças entre os espectros das diferentes soluções de glicose.

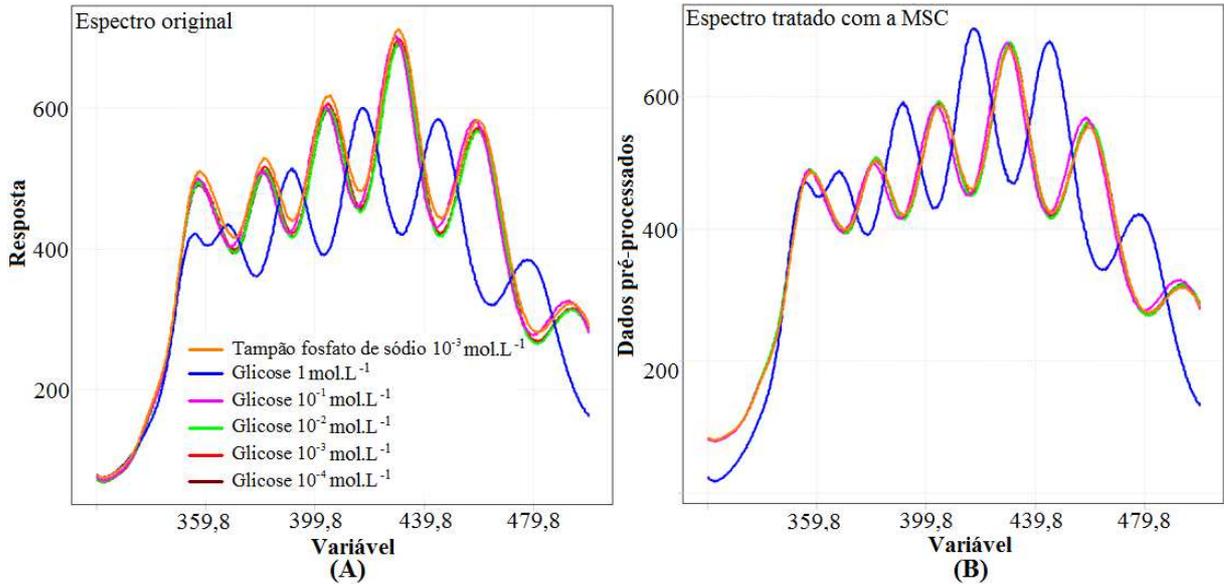


Figura 38: (A) Espectro de fotoluminescência original do teste do sensor de AAP sem filme LbL. (B) Espectro desse mesmo teste após a aplicação do algoritmo MSC. (λ_{ex} de 280 nm).

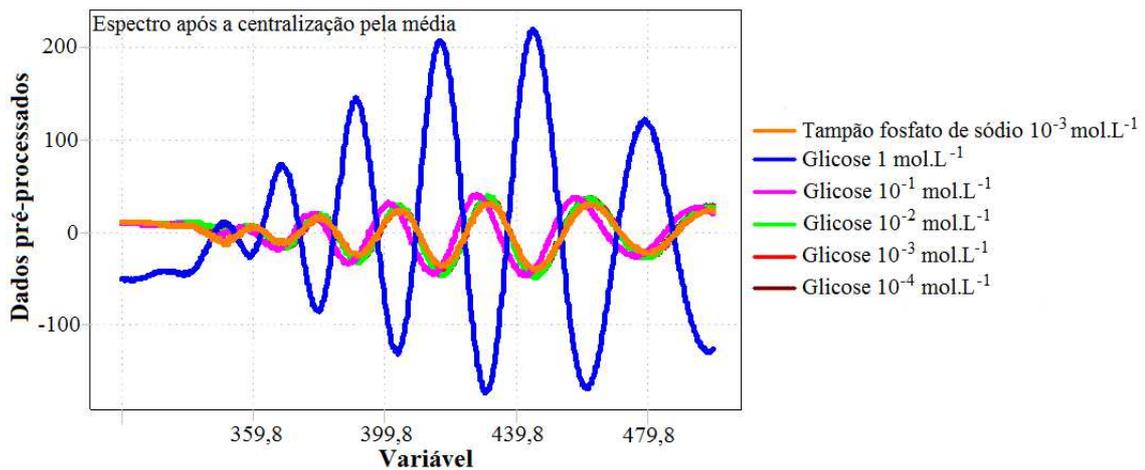


Figura 39: Espectro de fotoluminescência do teste da AAP sem filme LbL em soluções de glicose de várias concentrações após tratamento com MSC e centralização pela média.

Com a PCA foram obtidos os gráficos de pesos, Figura 40 (A), e de escores, Figura 40 (B). O gráfico de pesos ilustra a importância de cada variável na construção de cada componente principal, ou seja, determina quais variáveis são importantes para descrever as alterações nos espectros originais ^[101]. Foi verificado que apenas duas PCs foram necessárias para representar todo o conjunto de variáveis originais dos espectros. Isso ocorre devido à grande autocorrelação existente entre as variáveis. Analisando-se o gráfico de escores foi possível verificar que os espectros do tampão e das soluções de glicose de 10^{-4} mol.L⁻¹, 10^{-3} mol.L⁻¹, 10^{-2} mol.L⁻¹ e 10^{-1} mol.L⁻¹ tem escores semelhantes em PC1 e distintos do espectro da solução de 1 mol.L⁻¹. Entretanto, o escore de 10^{-1} mol.L⁻¹ se diferencia das outras soluções em relação à PC2. A

observação do gráfico de pesos pode oferecer um entendimento da relação entre os espectros no gráfico de escores. Na Figura 40 (A) foi observada que a contribuição de cada variável na construção das PCs constituiu perfis muito semelhantes aos espectros centralizados pela média e que os perfis de PC1 e PC2 foram semelhantes entre si, estando o perfil da PC2 fora de fase (*blueshift*) com o perfil da PC1. Assim, como os espectros das soluções de 10^{-4} mol.L⁻¹ a 10^{-1} mol.L⁻¹ tiveram escores semelhantes entre si e diferentes do escore do espectro da solução 1 mol.L⁻¹, foi possível inferir que a informação química representada em PC1 foi a intensidade de emissão. A PC2, por sua vez, representou o deslocamento que os espectros das soluções de glicose de 10^{-4} a 10^{-1} mol.L⁻¹ possuíram, sendo o espectro da solução 10^{-1} mol.L⁻¹ ligeiramente deslocado à esquerda em relação a esse grupo de medidas (Figura 39).

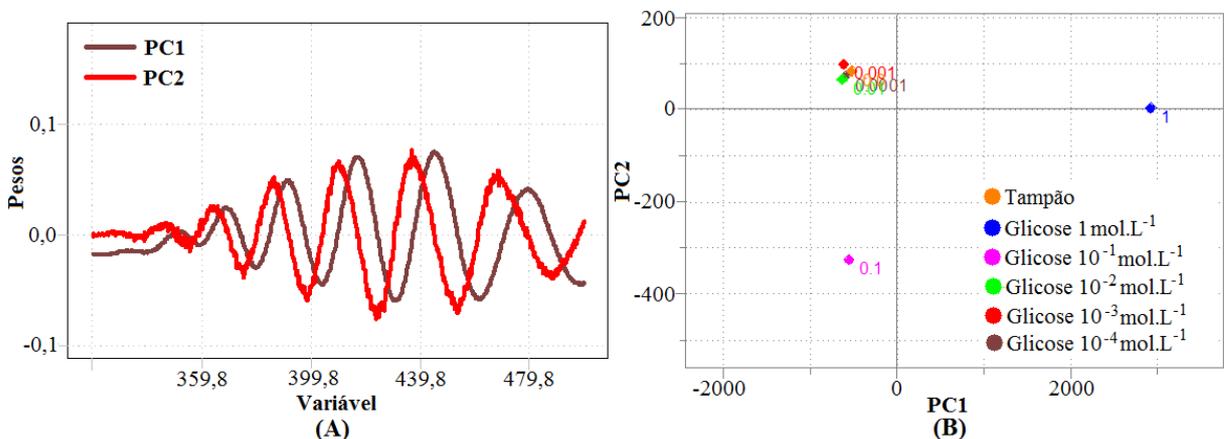


Figura 40: Gráficos de (A) pesos e de (B) escores obtidos através da PCA sobre os espectros do teste de AAP em glicose processados por MSC e centralizados pela média. A PC1 está relacionada à intensidade de emissão e a PC2 está associada ao deslocamento dos espectros.

De maneira geral foi possível concluir que a fatoração (transformação em componentes principais) foi uma abordagem que pôde evidenciar pequenas diferenças entre os espectros e que essas diferenças puderam ser ressaltadas por diferentes formas de processamento dos espectros (como a centralização pela média). Como foi possível a distinção dos espectros em função das concentrações, houve a possibilidade de obtenção de modelos de calibração multivariada que relacionassem os escores com a concentração de glicose. Para isto, o algoritmo PLS foi utilizado e diversos modelos foram criados e validados para a determinação de glicose com o sensor de AAP. Três testes foram feitos com a AAP sem modificação superficial em soluções de glicose de concentrações de 0,09 mol.L⁻¹, 0,10 mol.L⁻¹, 0,30 mol.L⁻¹, 0,50 mol.L⁻¹, 0,70 mol.L⁻¹, 0,90 mol.L⁻¹, 1,00 mol.L⁻¹ e 1,10 mol.L⁻¹. Os outros três testes foram realizados com a AAP contendo o filme LbL e com soluções de glicose de 0,009 mol.L⁻¹, 0,010 mol.L⁻¹,

0,030 mol.L⁻¹, 0,050 mol.L⁻¹, 0,070 mol.L⁻¹, 0,090 mol.L⁻¹, 0,100 mol.L⁻¹, 0,300 mol.L⁻¹, 0,500 mol.L⁻¹, 0,700 mol.L⁻¹, 0,900 mol.L⁻¹, 1,000 mol.L⁻¹, e 1,100 mol.L⁻¹. Todos os testes foram realizados por fotoluminescência nos comprimentos de onda de excitação de 280 nm e 320 nm. Para a análise quimiométrica, o método de calibração multivariada PLS foi aplicado nos espectros centralizados pela média, com e sem transformação dos mesmos, Figura 41. As transformações utilizadas foram a primeira derivada, segunda derivada, MSC, SNV e primeira ou segunda derivadas após a transformação com MSC ou SNV. Os resultados foram organizados de acordo com os seguintes parâmetros de desempenho analítico de cada modelo PLS: número de fatores empregado no modelo, RMSEP e R. Bons modelos possuem menores número de fatores e RMSEP, e o valor de R é o mais próximo possível de 1.

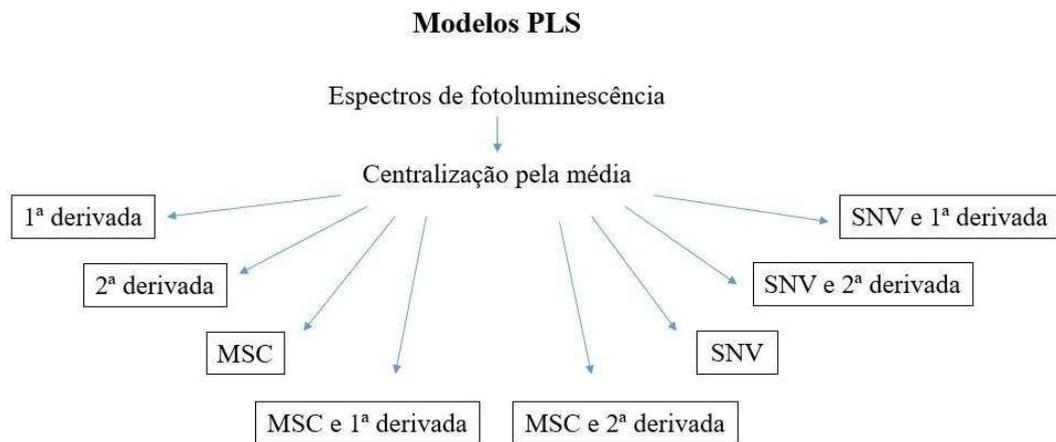


Figura 41: Esquema da aplicação do método de calibração multivariada PLS.

Para o sensor de AAP sem LbL e excitado a 280 nm, Figura 42, quando consideradas todas as réplicas na aplicação do algoritmo PLS, o menor RMSEP obtido no melhor conjunto de parâmetros foi de aproximadamente 0,06 mol.L⁻¹, Tabela 5, que é um erro alto para a determinação de glicose na faixa de 0,09 mol.L⁻¹ a 1,10 mol.L⁻¹. Isso pode estar relacionado à reprodutibilidade dos experimentos que será explicado a seguir em relação ao formato do espectro. Foi possível verificar também que os espectros das amostras 1 e 2 foram mais semelhantes entre si, enquanto os da amostra 3 foram mais distintos, inclusive com menor intensidade. Essas semelhanças e diferenças foram confirmadas pela submissão desses espectros à PCA, que resultou em um gráfico de escores em que os espectros da amostra 3 formaram um grupo distinto do grupo composto pelos espectros das amostras 1 e 2. Assim, os espectros da amostra 3 do conjunto de dados foram removidos e uma nova análise PLS foi realizada. Os erros de previsão foram menores, Tabela 6, e o tratamento escolhido foi o SNV.

Os valores de previsão desse modelo foram organizados na Tabela 7 e foi verificado que os valores de concentração de glicose previstos para as amostras 1 e 2 foram próximos aos valores de referência das concentrações.

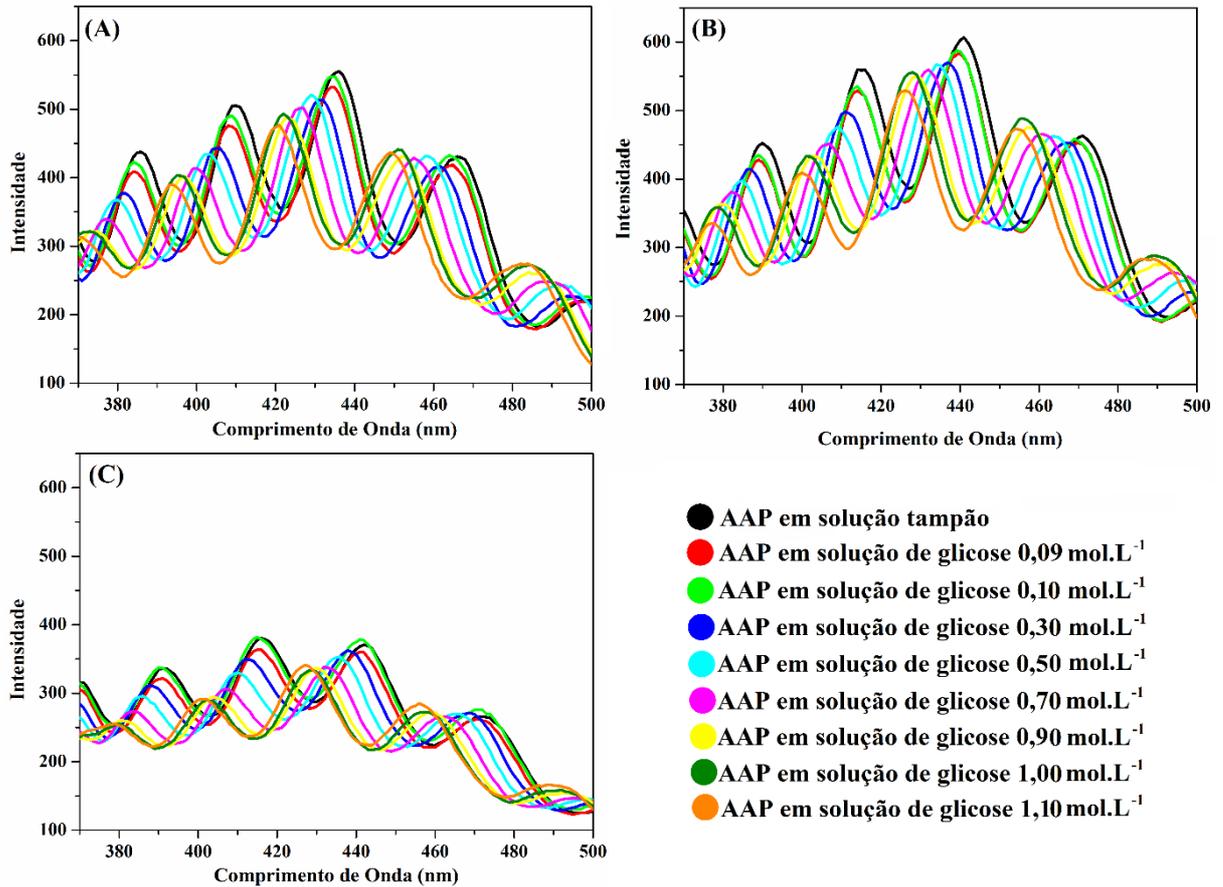


Figura 42: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP sem modificação superficial (λ_{ex} de 280 nm). (A) Amostra 1. (B) Amostra 2. (C) Amostra 3.

Tabela 5: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.

Tratamentos	Parâmetros		
	Fatores	RMSEP (mol.L ⁻¹)	R
Sem tratamento	5	0,0772	0,9785
1ª derivada	9	0,0852	0,9743
2ª derivada	7	0,1480	0,9216
MSC	7	0,0721	0,9813
MSC e 1ª derivada	7	0,0631	0,9857
MSC e 2ª derivada	8	0,0743	0,9801
SNV	7	0,0682	0,9834
SNV e 1ª derivada	7	0,0611	0,9866
SNV e 2ª derivada	8	0,0717	0,9814

Tabela 6: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.

Tratamentos	Parâmetros		
	Fatores	RMSEP (mol.L ⁻¹)	R
Sem tratamento	7	0,0234	0,9981
1ª derivada	8	0,0148	0,9992
2ª derivada	6	0,0517	0,9906
MSC	5	0,0230	0,9981
MSC e 1ª derivada	7	0,0169	0,9990
MSC e 2ª derivada	8	0,0336	0,9960
SNV	6	0,0173	0,9990
SNV e 1ª derivada	7	0,0156	0,9992
SNV e 2ª derivada	7	0,0441	0,9992

Tabela 7: Valores de referência e previstos com o modelo PLS tratado com SNV das concentrações de glicose dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.

Valor de referência (mol.L ⁻¹)	Valor previsto (mol.L ⁻¹)	
	Amostra 1	Amostra 2
0,090	0,099	0,103
0,100	0,100	0,098
0,300	0,304	0,270
0,500	0,498	0,514
0,700	0,698	0,691
0,900	0,904	0,890
1,000	1,002	1,002
1,100	1,044	1,109

Para o sensor de AAP sem filme LbL e excitado a 320 nm, Figura 43, quando consideradas todas as réplicas, o menor RMSEP, Tabela 8, também foi de aproximadamente 0,06 mol.L⁻¹, que é grande para a determinação de glicose na faixa de 0,09 a 1,10 mol.L⁻¹. Com a remoção dos espectros da amostra 3 e com uma nova análise PLS, os erros de previsão diminuíram, Tabela 9, e o tratamento escolhido foi o MSC seguido de 1ª derivada, com RMSEP de aproximadamente 0,01 mol.L⁻¹ de glicose. A Tabela 10 apresenta os valores de referência das concentrações de glicose e os previstos pelo modelo escolhido. Foi possível verificar que a faixa de resposta do sensor foi de 0,1 mol.L⁻¹ a 1,10 mol.L⁻¹, já que os valores previstos foram próximos dos de referência considerando o erro de 0,01 mol.L⁻¹.

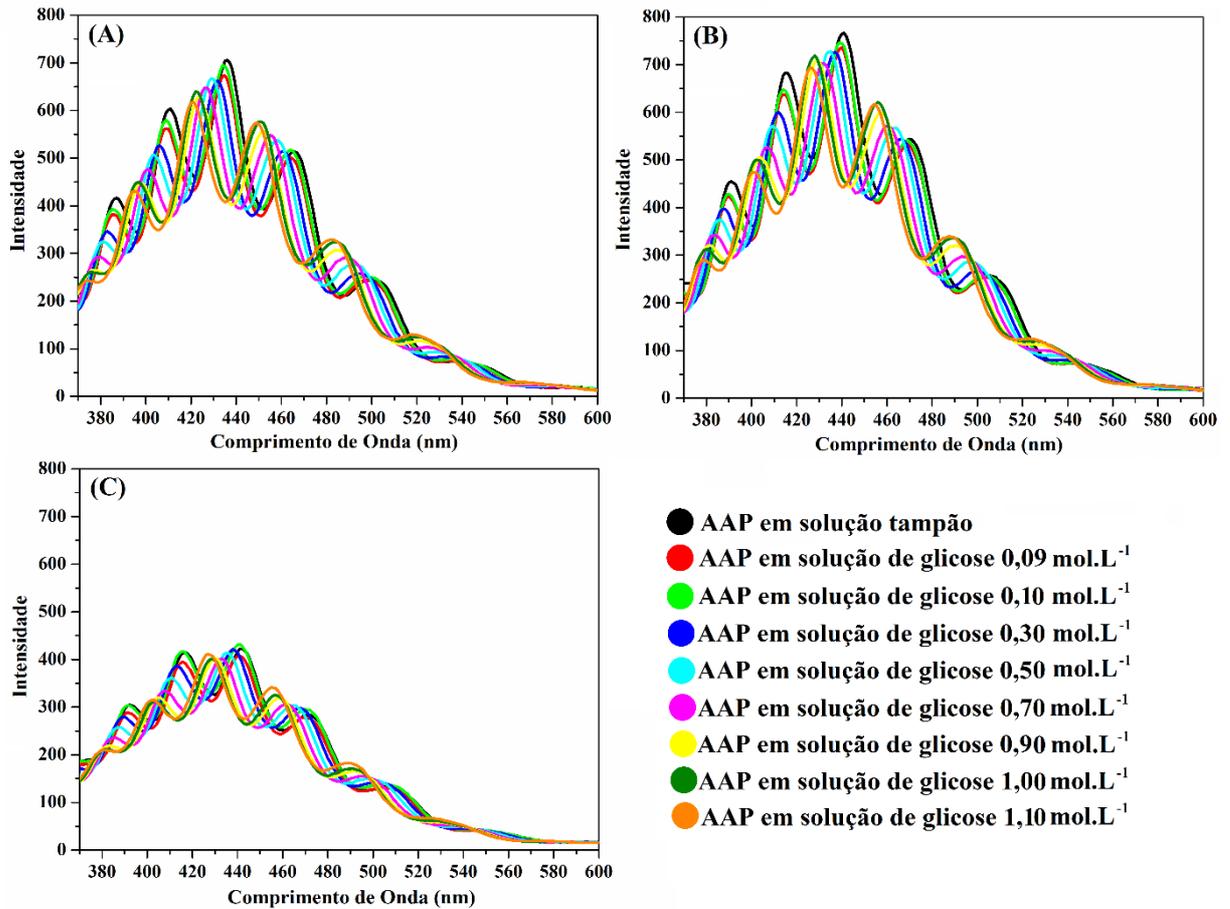


Figura 43: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP sem modificação superficial (λ_{ex} de 320 nm). (A) Amostra 1. (B) Amostra 2. (C) Amostra 3.

Tabela 8: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.

Tratamentos	Fatores	Parâmetros	
		RMSEP (mol.L^{-1})	R
Sem tratamento	8	0,0836	0,9761
1ª derivada	7	0,0980	0,9657
2ª derivada	8	0,1179	0,9522
MSC	8	0,0694	0,9826
MSC e 1ª derivada	9	0,0606	0,9869
MSC e 2ª derivada	8	0,1090	0,9587
SNV	8	0,0575	0,9881
SNV e 1ª derivada	10	0,0557	0,9891
SNV e 2ª derivada	10	0,0993	0,9671

Tabela 9: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.

Tratamentos	Fatores	Parâmetros	
		RMSEP (mol.L ⁻¹)	R
Sem tratamento	7	0,0165	0,9991
1 ^a derivada	7	0,0136	0,9994
2 ^a derivada	6	0,0367	0,9954
MSC	6	0,0135	0,9994
MSC e 1 ^a derivada	6	0,0112	0,9996
MSC e 2 ^a derivada	7	0,0318	0,9964
SNV	6	0,0138	0,9994
SNV e 1 ^a derivada	7	0,0105	0,9996
SNV e 2 ^a derivada	7	0,0324	0,9963

Tabela 10: Valores de referência e previstos com PLS das concentrações de glicose dos testes das amostras 1 e 2 de AAP sem filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.

Valor de referência (mol.L ⁻¹)	Valor previsto (mol.L ⁻¹)	
	Amostra 1	Amostra 2
0,090	0,086	0,106
0,100	0,109	0,092
0,300	0,285	0,275
0,500	0,506	0,508
0,700	0,708	0,714
0,900	0,900	0,895
1,000	1,001	0,990
1,100	1,083	1,101

Em relação ao desempenho do sensor de AAP sem modificação superficial excitado a 280 nm e a 320 nm, a capacidade de previsão do sensor foi semelhante, o que indica que o mesmo pode ser excitado em qualquer um dos comprimentos de onda sem que haja comprometimento da eficiência do sensor.

Para o sensor de AAP com filme LbL e excitado a 280 nm, Figura 44, considerando-se todas as réplicas, os erros de predição foram maiores do que os obtidos para o sensor de AAP sem filme LbL, sendo o menor RMSEP de aproximadamente $0,09 \text{ mol.L}^{-1}$, Tabela 11. Considerando-se a reprodutibilidade como principal motivo pelo alto valor de RMSEP, uma PCA foi realizada nos espectros. Foi verificado que as medidas obtidas pelos três biossensores formaram grupos distintos entre si, o que indica que o processo de fabricação de filmes LbL apresenta uma menor reprodutibilidade nesse caso. Dessa forma, decidiu-se testar os modelos PLS aplicados para cada biossensor individualmente para se avaliar se o sensor modificado é melhor que o não modificado por LbL e os melhores resultados para cada amostra foram dispostos na Tabela 12. O modelo com o melhor conjunto de parâmetros apresentou um valor de RMSEP na ordem de $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ referente à amostra 6, o que também indicou uma boa capacidade de previsão de baixas concentrações de glicose. Na Tabela 13 foram organizadas as concentrações preditas relativas ao modelo com RMSEP $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ da amostra 6, sendo dispostas apenas as concentrações mais baixas de glicose, $0,009 \text{ mol.L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Analisando a Tabela 13, foi verificado que o biossensor respondeu à presença de glicose nas concentrações de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pois os valores previstos pelo modelo PLS foram próximos aos valores de referência das concentrações.

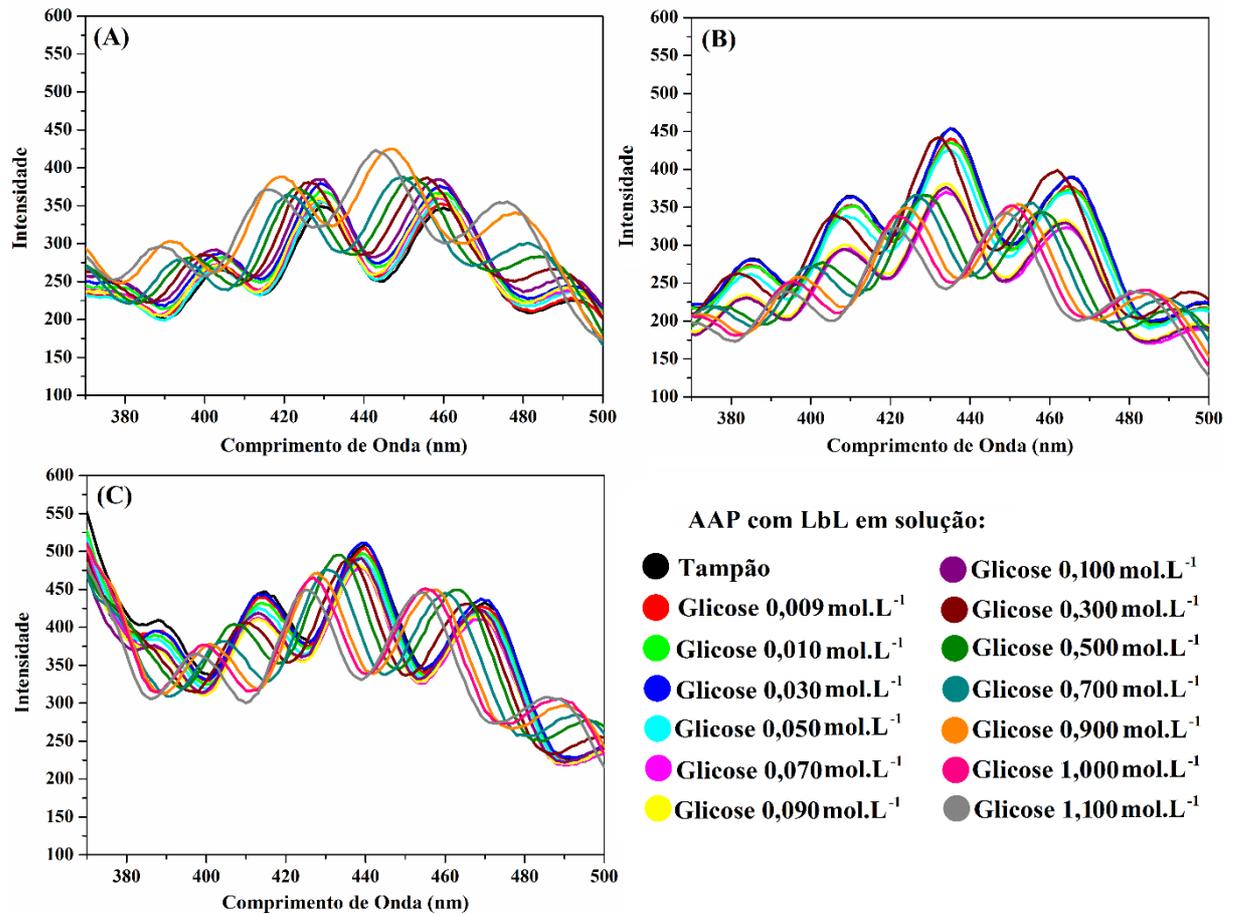


Figura 44: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP com filme LbL (λ_{ex} de 280 nm). (A) Amostra 4. (B) Amostra 5. (C) Amostra 6.

Tabela 11: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.

Tratamentos	Fatores	Parâmetros	
		RMSEP (mol.L ⁻¹)	R
Sem tratamento	9	0,0936	0,9711
1ª derivada	8	0,0963	0,9693
2ª derivada	5	0,1055	0,9629
MSC	5	0,1100	0,9595
MSC e 1ª derivada	5	0,1118	0,9582
MSC e 2ª derivada	4	0,1094	0,9600
SNV	7	0,0862	0,9756
SNV e 1ª derivada	7	0,0873	0,9747
SNV e 2ª derivada	4	0,0975	0,9684

Tabela 12: Melhores resultados dos modelos PLS aplicados aos biossensores individualmente - λ_{ex} de 280 nm.

	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Parâmetros	MSC e 1ª derivada	SNV e 1ª derivada	MSC e 2ª derivada
Fatores	5	3	4
RMSEP (mol.L⁻¹)	0,0141	0,0320	0,0156
R	0,9994	0,9969	0,9992

Tabela 13: Valores de referência e previstos com PLS das concentrações mais baixas de glicose do teste da amostra 6 de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 280 nm.

	Valor previsto (mol.L⁻¹)
Valor de referência (mol.L⁻¹)	Amostra 6
0,009	0,013
0,010	0,011
0,030	0,030
0,050	0,045
0,070	0,072
0,090	0,090
0,100	0,099

Para o biossensor de AAP com GOx e excitado a 320 nm, Figura 45, quando consideradas todas as réplicas, os erros de predição, Tabela 14, foram maiores do que os obtidos para o sensor de AAP sem filme LbL, sendo o menor RMSEP de 0,05 mol.L⁻¹. Entretanto, comparando-se com o RMSEP de 0,09 mol.L⁻¹ obtido a partir dos espectros com excitação a 280 nm, houve uma diminuição que pode estar relacionada ao comprimento de onda de excitação diferente. Talvez, com o comprimento de onda de 320 nm ocorreu uma melhora na reprodutibilidade do sinal óptico que refletiu em um RMSEP menor. Os modelos PLS foram aplicados em cada biossensor individualmente, Tabela 15, e o modelo com o melhor conjunto de parâmetros apresentou um RMSEP de 0,008 mol.L⁻¹, menor do que o obtido para excitação a 280 nm, que foi de 0,020 mol.L⁻¹. Entretanto, os valores previstos de concentrações de glicose não foram obtidos para a comparação com os valores de referência nesse caso.

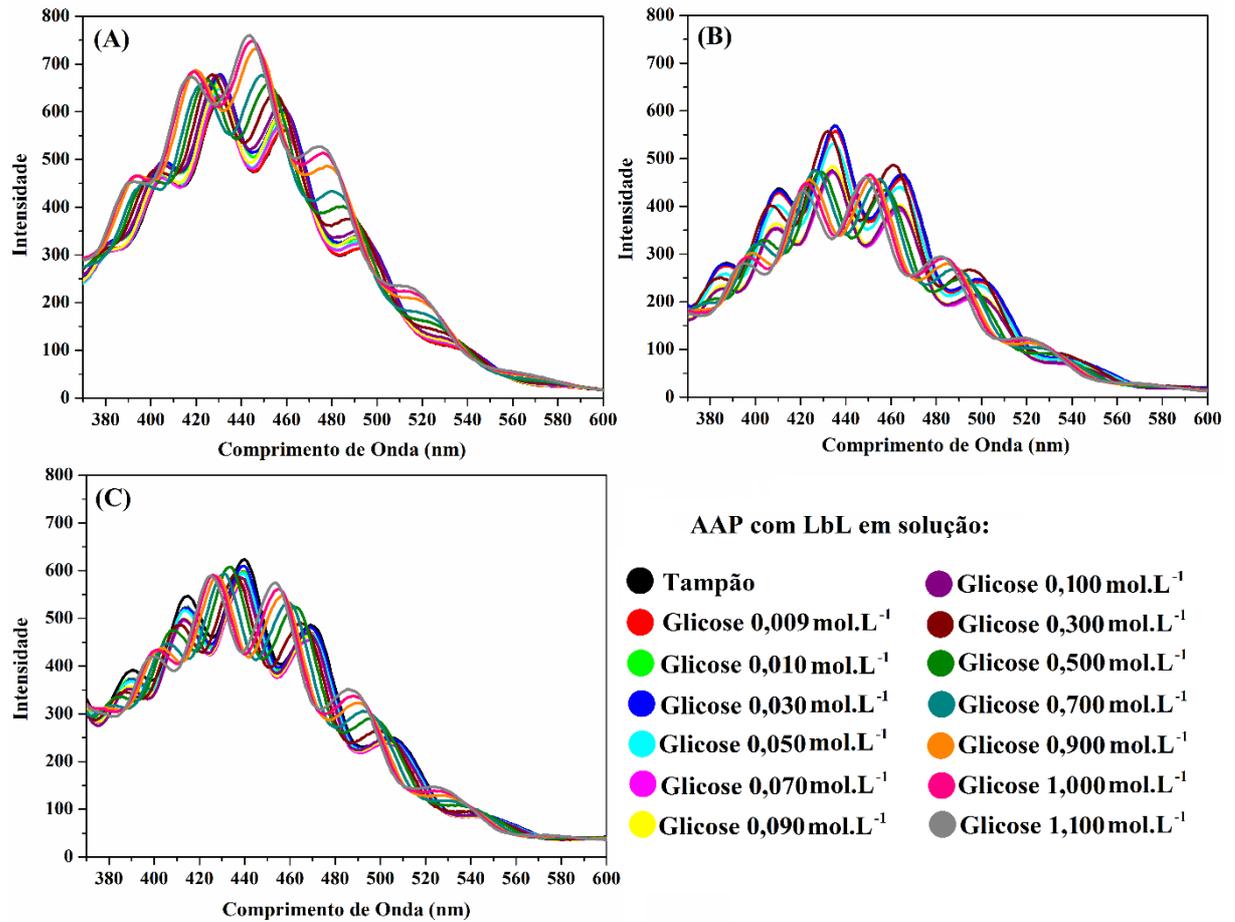


Figura 45: Espectros de fotoluminescência dos testes do sensor de AAP com filme LbL (λ_{ex} de 320 nm). (A) Amostra 4. (B) Amostra 5. (C) Amostra 6.

Tabela 14: Resultados dos modelos PLS aplicados nos espectros de fotoluminescência dos testes de todas as amostras de AAP com filme LbL - λ_{ex} de 320 nm.

Parâmetros			
Tratamentos	Fatores	RMSEP (mol.L ⁻¹)	R
Sem tratamento	6	0,0692	0,9848
1 ^a derivada	6	0,0705	0,9842
2 ^a derivada	8	0,0707	0,9841
MSC	6	0,0530	0,9912
MSC e 1 ^a derivada	6	0,0505	0,9919
MSC e 2 ^a derivada	7	0,0556	0,9902
SNV	6	0,0528	0,9912
SNV e 1 ^a derivada	6	0,0495	0,9922
SNV e 2 ^a derivada	7	0,0551	0,9904

Tabela 15: Melhores resultados dos modelos PLS aplicados aos biossensores individualmente - λ_{ex} de 320 nm.

	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Parâmetros	MSC e 1ª derivada	SNV e 1ª derivada	MSC e 2ª derivada
Fatores	3	5	5
RMSEP (mol.L⁻¹)	0,0206	0,0190	0,0078
R	0,9987	0,9990	0,9998

Foi verificado então que a modificação da AAP com o filme LbL levou a uma menor reprodutibilidade na obtenção dos espectros do teste do biossensor, resultando na baixa capacidade preditiva dos modelos. Isto pode ser explicado devido à dificuldade de se reproduzir a deposição do filme LbL ao longo da superfície da AAP, como foi verificado na Figura 35. Além disso, a aplicação da PCA enfatizou essa dificuldade de reprodutibilidade do filme LbL, sendo verificado que as medidas obtidas pelos três biossensores formaram grupos distintos entre si. Dessa forma, pode-se considerar que a modificação superficial por LbL de uma amostra de AAP é possível, mas apresenta dificuldades como método de tratamento da superfície de AAP quando visa à fabricação de biossensores devido a sua baixa reprodutibilidade. Embora seja uma técnica simples, a deposição por camadas (LbL) apresenta desvantagens quando associada a filmes de AAP. Sugere-se que, nesse caso, técnicas mais avançadas de modificação de superfícies, como tratamento de plasma com funcionalização da superfície do óxido ou o emprego de técnicas para modificar nanoestruturas como a de Langmuir-Blodgett, talvez sejam as mais indicadas. Entretanto, as amostras individuais de AAP com o filme LbL responderam na faixa de concentrações de 0,01 mol.L⁻¹ a 0,10 mol.L⁻¹. Não foi possível determinar concentrações mais baixas de glicose, já que essa possibilidade não foi avaliada utilizando a AAP sem a deposição da GOx.

Outro ponto a ser destacado foi a viabilidade de se utilizar a quimiometria na análise da resposta do sensor de AAP com ou sem a deposição do filme LbL. A análise por PLS foi possível mesmo com a baixa reprodutibilidade nos filmes de AAP modificados com LbL e se mostrou como uma alternativa viável em contrapartida à utilização da análise dos espectros pelos conceitos envolvidos na equação de Fabry-Pérot e da determinação de parâmetros ópticos integrais a partir de todo o espectro, como o caso do parâmetro “índice de refração efetivo”. Além disso, foi verificado que a utilização da análise multivariada permitiu a previsão de uma concentração de glicose de até 0,01 mol.L⁻¹ a partir de uma plataforma de AAP modificada por

LbL, o que está de acordo com a literatura, em que a AAP sem modificação superficial responde à presença de glicose com um limite de detecção de $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ [31], sendo esse resultado determinado com os conceitos envolvidos na equação de Fabry-Pérot. Dessa forma, é possível considerar que a análise multivariada das interferências de Fabry-Pérot também se mostra eficaz para o estudo das respostas dos sensores com plataforma de AAP.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram verificadas a obtenção de amostras de AAP bem estruturadas e a possibilidade de modificação da superfície dessas amostras através da técnica LbL. Dessa forma, a deposição de filmes de PAH/PVS/PAH/GOx foi acompanhada através das técnicas de fotoluminescência e reflectância total, visando à fabricação de um biossensor óptico de glicose. Analisando os espectros obtidos, foram verificados um aumento na intensidade de fotoluminescência e uma diminuição da reflectância total à medida que o filme LbL era depositado. Esses comportamentos eram esperados devido à enzima GOx ser fotoluminescente pela presença dos triptofanos em sua estrutura e à maior absorção da radiação e consequente diminuição de sua reflexão. Assim, pode-se considerar que a deposição do filme LbL foi eficaz, mesmo que o desvio-padrão apresentado tenha sido alto para as camadas de PVS e de PAH. As discrepâncias entre as duplicatas dessas camadas estão relacionadas às quantidades de PVS e de PAH adsorvidas em cada filme, sendo que este erro pode estar associado a alguma mudança de posição sofrida pela AAP durante a fabricação do filme automontado, o que altera a intensidade no espectro de fotoluminescência.

Em relação ao teste do sensor, quando os resultados foram analisados qualitativamente de acordo com os deslocamentos das oscilações de Fabry-Pérot, um limite de detecção de $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ foi determinado para a AAP com e sem modificação superficial. Ao se utilizar a quimiometria para analisar os dados dos testes dos sensores, foi verificado que a AAP sem filme LbL respondeu a uma faixa de concentração de glicose de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ a $1,10 \text{ mol.L}^{-1}$. Além disso, foi constatado também que a AAP com a GOx depositada respondeu a um intervalo de concentrações de glicose de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ a $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$, faixa reportada na literatura para filmes de AAP sem modificação da superfície. Entretanto, não foi possível confirmar com PLS que a presença da GOx influenciou na sensibilidade da resposta da AAP à presença da glicose, pois o sensor sem a modificação superficial não foi testado com concentrações inferiores a $0,09 \text{ mol.L}^{-1}$.

Além disso, um ponto a ser destacado foi a possibilidade de se utilizar a quimiometria na análise da resposta do sensor de AAP com ou sem a deposição do filme LbL, sendo uma alternativa à utilização da análise dos espectros pelos conceitos envolvidos na equação de Fabry-Pérot descrita na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Uskoković, V., Nanotechnologies: What we do not know. *Technology in Society*, 29 (1), 43-61, 2007.
- [2] Gultepe, E.; Nagesha, D.; Sridhar, S.; Amiji, M., Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (3), 305-315, 2010.
- [3] He, H.; Grignol, V.; Karpa, V.; Yen, C.; LaPerle, K.; Zhang, X.; Jones, N. B.; Liang, M. I.; Lesinski, G. B.; Ho, W. S. W.; Carson Iii, W. E.; Lee, L. J., Use of a nanoporous biodegradable miniature device to regulate cytokine release for cancer treatment. *Journal of Controlled Release*, 151 (3), 239-245, 2011.
- [4] Wei, S.; Han, D.-D.; Guo, L.; He, Y.; Ding, H.; Zhang, Y.-L.; Xiao, F.-S., In situ immobilization of tin dioxide nanoparticles by nanoporous polymers scaffold toward monolithic humidity sensing devices. *Journal of Colloid and Interface Science*, 431 (0), 17-23, 2014.
- [5] Döring, V.; Süß, T.; Hierold, C., Efficient transfer of carbon nanotubes for device fabrication using an LOR resist sacrificial layer. *Sensors and Actuators A: Physical*, 208 (0), 152-158, 2014.
- [6] Huang, Y.; Sudibya, H. G.; Chen, P., Detecting metabolic activities of bacteria using a simple carbon nanotube device for high-throughput screening of anti-bacterial drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (10), 4257-4261, 2011.
- [7] Lai, K. W. C.; Xi, N.; Fung, C. K. M.; Chen, H., Packaging Processes for Carbon Nanotube-Based Devices. In *Nano Optoelectronic Sensors and Devices*, Lai, N. X. W. C., Ed. William Andrew Publishing: Oxford, pp 93-105, 2012.
- [8] Zhang, C. X.; Zhang, E. X.; Fleetwood, D. M.; Alles, M. L.; Schrimpf, R. D.; Rutherglen, C.; Galatsis, K., Total-ionizing-dose effects and reliability of carbon nanotube FET devices. *Microelectronics Reliability*, 54 (11), 2355-2359, 2014.
- [9] Georgiev, Y. M.; Petkov, N.; McCarthy, B.; Yu, R.; Djara, V.; O'Connell, D.; Lotty, O.; Nightingale, A. M.; Thamsumet, N.; de Mello, J. C.; Blake, A.; Das, S.; Holmes, J. D., Fully CMOS-compatible top-down fabrication of sub-50 nm silicon nanowire sensing devices. *Microelectronic Engineering*, 118 (0), 47-53, 2014.
- [10] Williams, E. H.; Ha, J.-Y.; Juba, M.; Bishop, B.; Krylyuk, S.; Motayed, A.; Rao, M. V.; Schreifels, J. A.; Davydov, A. V., Real-time electrical detection of the formation and

- destruction of lipid bilayers on silicon nanowire devices. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 4 (0), 103-108, 2015.
- [11] Sulka, G. D., Highly Ordered Anodic Porous Alumina Formation by Self-Organized Anodizing. In *Nanostructured Materials in Electrochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 1-116, 2008.
- [12] Dastmalchi, P.; Haddadpour, A.; Veronis, G., Nanophotonics: devices for manipulating light at the nanoscale. In *Nanolithography*, Feldman, M., Ed. Woodhead Publishing, pp 376-398, 2014.
- [13] Elesin, Y.; Lazarov, B. S.; Jensen, J. S.; Sigmund, O., Time domain topology optimization of 3D nanophotonic devices. *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications*, 12 (1), 23-33, 2014.
- [14] Lamberti, A., Microfluidic photocatalytic device exploiting PDMS/TiO₂ nanocomposite. *Applied Surface Science*, 335 (0), 50-54, 2015.
- [15] Jayamohan, H.; Smith, Y. R.; Hansen, L. C.; Mohanty, S. K.; Gale, B. K.; Misra, M., Anodized titania nanotube array microfluidic device for photocatalytic application: Experiment and simulation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 174-175 (0), 167-175, 2015.
- [16] SadAbadi, H.; Badilescu, S.; Packirisamy, M.; Wüthrich, R., Integration of gold nanoparticles in PDMS microfluidics for lab-on-a-chip plasmonic biosensing of growth hormones. *Biosensors and Bioelectronics*, 44 (0), 77-84, 2013.
- [17] Shokry Hassan, H.; Kashyout, A. B.; Morsi, I.; Nasser, A. A. A.; Ali, I., Synthesis, characterization and fabrication of gas sensor devices using ZnO and ZnO:In nanomaterials. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (3), 216-221, 2014.
- [18] Qu, Z.; Zhao, Q.; Meng, Y., Improvement of sensitivity of eddy current sensors for nano-scale thickness measurement of Cu films. *NDT & E International*, 61 (0), 53-57, 2014.
- [19] Keller, F.; Hunter, M. S.; Robinson, D. L., Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum. *Journal of The Electrochemical Society*, 100 (9), 411-419, 1953.
- [20] Alejandro, A. S. Structural Engineering of Nanoporous Anodic Alumina and Applications. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2010.
- [21] Kudoh, Y.; Kojima, T.; Fukuyama, M.; Tsuchiya, S.; Yoshimura, S., Covering anodized aluminum with electropolymerized polypyrrole via manganese oxide layer and application to solid electrolytic capacitor. *Journal of Power Sources*, 60 (2), 157-163, 1996.
- [22] Scaduto, G.; Santamaria, M.; Bocchetta, P.; Di Quarto, F., The effect of hydration layers on the anodic growth and on the dielectric properties of Al₂O₃ for electrolytic capacitors. *Thin Solid Films*, 550 (0), 128-134, 2014.

- [23] Qin, W.; Lei, B.; Peng, C.; Wu, J., Corrosion resistance of ultra-high purity porous alumina ceramic support. *Materials Letters*, 144 (0), 74-77, 2015.
- [24] Kern, F.; Palmero, P.; Marro, F. G.; Mestra, A., Processing of alumina–zirconia composites by surface modification route with enhanced hardness and wear resistance. *Ceramics International*, 41 (1, Part B), 889-898, 2015.
- [25] Tsangaraki-Kaplanoglou, I.; Theohari, S.; Dimogerontakis, T.; Kallithrakas-Kontos, N.; Wang, Y.-M.; Kuo, H.-H.; Kia, S., An investigation of electrolytic coloring process of anodized aluminum coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201 (6), 2749-2759, 2006.
- [26] Hakimizad, A.; Raeissi, K.; Ashrafizadeh, F., Characterization of aluminum anodized layers modified in sulfuric and phosphoric acid baths and their effect on conventional electrolytic coloring. *Surface and Coatings Technology*, 206 (8–9), 2438-2445, 2012.
- [27] Diggle, J. W.; Downie, T. C.; Goulding, C. W., Anodic oxide films on aluminum. *Chemical Reviews*, 69 (3), 365-405, 1969.
- [28] Masuda, H.; Fukuda, K., Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science*, 268 (5216), 1466-1468, 1995.
- [29] Santos, A.; Kumeria, T.; Losic, D., Nanoporous anodic aluminum oxide for chemical sensing and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 44 (0), 25-38, 2013.
- [30] Santos, A.; Balderrama, V.; Alba, M.; Formentín, P.; Ferré-Borrull, J.; Pallarès, J.; Marsal, L., Tunable Fabry-Pérot interferometer based on nanoporous anodic alumina for optical biosensing purposes. *Nanoscale Res Lett*, 7 (1), 1-4, 2012.
- [31] Santos, A.; Kumeria, T.; Losic, D., Optically Optimized Photoluminescent and Interferometric Biosensors Based on Nanoporous Anodic Alumina: A Comparison. *Analytical Chemistry*, 85 (16), 7904-7911, 2013.
- [32] Kumeria, T.; Santos, A.; Losic, D., Ultrasensitive Nanoporous Interferometric Sensor for Label-Free Detection of Gold(III) Ions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (22), 11783-11790, 2013.
- [33] Kumeria, T.; Gulati, K.; Santos, A.; Losic, D., Real-time and in Situ Drug Release Monitoring from Nanoporous Implants under Dynamic Flow Conditions by Reflectometric Interference Spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (12), 5436-5442, 2013.
- [34] Trivinho-Strixino, F.; Guerreiro, H. A.; Gomes, C. S.; Pereira, E. C.; Guimarães, F. E. G., Active waveguide effects from porous anodic alumina: An optical sensor proposition. *Applied Physics Letters*, 97 (1), 011902, 2010.
- [35] Thompson, G. E., Porous anodic alumina: fabrication, characterization and applications. *Thin Solid Films*, 297 (1–2), 192-201, 1997.

- [36] Santos, A.; Macías, G.; Ferré-Borrull, J.; Pallarès, J.; Marsal, L. F., Photoluminescent Enzymatic Sensor Based on Nanoporous Anodic Alumina. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4 (7), 3584-3588, 2012.
- [37] Kumeria, T.; Santos, A.; Rahman, M. M.; Ferré-Borrull, J.; Marsal, L. F.; Losic, D., Advanced Structural Engineering of Nanoporous Photonic Structures: Tailoring Nanopore Architecture to Enhance Sensing Properties. *ACS Photonics*, 1 (12), 1298-1306, 2014.
- [38] Jani, A. M. M.; Kempson, I. M.; Losic, D.; Voelcker, N. H., Dressing in Layers: Layering Surface Functionalities in Nanoporous Aluminum Oxide Membranes. *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (43), 7933-7937, 2010.
- [39] Brevnov, D. A.; Barela, M.; Piyasena, M. E.; López, G. P.; Atanassov, P. B., Patterning of Nanoporous Anodic Aluminum Oxide Arrays by Using Sol–Gel Processing, Photolithography, and Plasma Etching. *Chemistry of Materials*, 16 (4), 682-687, 2004.
- [40] Ansari, S. G.; Ansari, Z. A.; Wahab, R.; Kim, Y.-S.; Khang, G.; Shin, H.-S., Glucose sensor based on nano-baskets of tin oxide templated in porous alumina by plasma enhanced CVD. *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (12), 1838-1842, 2008.
- [41] Krismastuti, F. S. H.; Bayat, H.; Voelcker, N. H.; Schönherr, H., Real Time Monitoring of Layer-by-Layer Polyelectrolyte Deposition and Bacterial Enzyme Detection in Nanoporous Anodized Aluminum Oxide. *Analytical Chemistry*, 87 (7), 3856-3863, 2015.
- [42] Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C.; Oliveira Jr., O. N. d., Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, 24, 228-235, 2001.
- [43] Decher, G.; Schlenoff, J. B., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*. Wiley: 2012.
- [44] Iler, R. K., Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21 (6), 569-594, 1966.
- [45] Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J., Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210–211, Part 2 (0), 831-835, 1992.
- [46] Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*, 277 (5330), 1232-1237, 1997.
- [47] Chen, Y.; He, F.; Ren, Y.; Peng, H.; Huang, K., Fabrication of chitosan/PAA multilayer onto magnetic microspheres by LbL method for removal of dyes. *Chemical Engineering Journal*, 249 (0), 79-92, 2014.

- [48] Estevam, R. B.; Ferreira, R. T.; Bischof, A. B. H.; dos Santos, F. S.; Santos, C. S.; Fujiwara, S. T.; Wohnrath, K.; Lazaro, S. R.; Garcia, J. R.; Pessoa, C. A., Preparation and characterization of LbL films based on graphene oxide nanoparticles interacting with 3-n-propylpyridinium silsesquioxane chloride. *Surface and Coatings Technology*, 275 (0), 2-8, 2015.
- [49] Vo-Dinh, T.; Cullum, B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem*, 366 (6-7), 540-551, 2000.
- [50] Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira Jr, O. N.; Córdoba de Torresi, S. I., Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (12), 1611-1615, 2004.
- [51] Santos, J. C. d. C. Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo São Carlos, 2012.
- [52] Clark, L. C.; Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 (1), 29-45, 1962.
- [53] Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y., Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10 (5), 4558, 2010.
- [54] Wang, J., Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis*, 13 (12), 983-988, 2001.
- [55] Updike, S. J.; Hicks, G. P., The Enzyme Electrode. *Nature*, 214 (5092), 986-988, 1967.
- [56] Guilbault, G. G.; Montalvo, J. G., Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 91 (8), 2164-2165, 1969.
- [57] Guilbault, G. G.; Lubrano, G. J., An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 64 (3), 439-455, 1973.
- [58] Bindra, D. S.; Zhang, Y.; Wilson, G. S.; Sternberg, R.; Thevenot, D. R.; Moatti, D.; Reach, G., Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring. *Analytical Chemistry*, 63 (17), 1692-1696, 1991.
- [59] Dung, N. Q.; Patil, D.; Duong, T. T.; Jung, H.; Kim, D.; Yoon, S.-G., An amperometric glucose biosensor based on a GOx-entrapped TiO₂-SWCNT composite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166-167 (0), 103-109, 2012.
- [60] Graça, J. S.; de Oliveira, R. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M., Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. *Bioelectrochemistry*, 96 (0), 37-42, 2014.
- [61] Davis, J.; Huw Vaughan, D.; Cardosi, M. F., Elements of biosensor construction. *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (12), 1030-1035, 1995.

- [62] Zhang, J.; Wang, C.; Chen, S.; Yuan, D.; Zhong, X., Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase–lectin biospecific interaction. *Enzyme and Microbial Technology*, 52 (3), 134-140, 2013.
- [63] Wong, C.; Wong, K.; Chen, X., Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78 (6), 927-938, 2008.
- [64] Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L., Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27 (4), 489-501, 2009.
- [65] Almino, M. A. F. B.; Queiroz, M. V. O.; Jorge, M. S. B., Diabetes mellitus na adolescência: experiências e sentimentos dos adolescentes e das mães com a doença. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 43, 760-767, 2009.
- [66] American Diabetes, A., Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33 (Suppl 1), S62-S69, 2010.
- [67] Diabetes, S. B. d., Atlas do Diabetes 2014 6ª edição ed.; Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/pdf/Atlas-IDF-2014.pdf>>. Acessado em: 2014.
- [68] Rinaldi, A. L.; Carballo, R., Impedimetric non-enzymatic glucose sensor based on nickel hydroxide thin film onto gold electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*.
- [69] Basiruddin, S. K.; Swain, S. K., Phenylboronic acid functionalized reduced graphene oxide based fluorescence nano sensor for glucose sensing. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 103-109, 2016.
- [70] Jia, M.-Y.; Wu, Q.-S.; Li, H.; Zhang, Y.; Guan, Y.-F.; Feng, L., The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 1029-1037, 2015.
- [71] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., Proceedings of the Multivariate Statistical Workshop for Geologists and Geochemists Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2 (1), 37-52, 1987.
- [72] Asoh, H.; Nishio, K.; Nakao, M.; Tamamura, T.; Masuda, H., Conditions for Fabrication of Ideally Ordered Anodic Porous Alumina Using Pretextured Al. *Journal of The Electrochemical Society*, 148 (4), B152-B156, 2001.
- [73] Costa, T. S. O., D. L.; Guimarães, P. I. C.; Merçon, F., Experimentos com Alumínio. *Química Nova na Escola*, p 3, maio, 2006.
- [74] Nourmohammadi, A.; Asadabadi, S.; Yousefi, M.; Ghasemzadeh, M., Photoluminescence emission of nanoporous anodic aluminum oxide films prepared in phosphoric acid. *Nanoscale Res Lett*, 7 (1), 1-7, 2012.

- [75] Montero Moreno, J. M.; Waleczek, M.; Martens, S.; Zierold, R.; Görlitz, D.; Martínez, V. V.; Prida, V. M.; Nielsch, K., Constrained Order in Nanoporous Alumina with High Aspect Ratio: Smart Combination of Interference Lithography and Hard Anodization. *Advanced Functional Materials*, 24 (13), 1857-1863, 2014.
- [76] Huang, G. S.; Wu, X. L.; Siu, G. G.; Chu, P. K., On the origin of light emission from porous anodic alumina formed in sulfuric acid. *Solid State Communications*, 137 (11), 621-624, 2006.
- [77] Keshavarz, A.; Parang, Z.; Nasser, A., The effect of sulfuric acid, oxalic acid, and their combination on the size and regularity of the porous alumina by anodization. *J Nanostruct Chem*, 3 (1), 1-4, 2013.
- [78] Zaraska, L.; Stępniewski, W.; Sulka, G.; Ciepiela, E.; Jaskuła, M., Analysis of nanopore arrangement and structural features of anodic alumina layers formed by two-step anodizing in oxalic acid using the dedicated executable software. *Appl. Phys. A*, 114 (2), 571-577, 2014.
- [79] Voon, C. H.; Derman, M. N.; Hashim, U.; Ahmad, K. R.; Foo, K. L., Effect of Temperature of Oxalic Acid on the Fabrication of Porous Anodic Alumina from Al-Mn Alloys. *Journal of Nanomaterials*, 8, 2013.
- [80] Chen, C. L. Z., Anodic Aluminum Oxide-based Nanostructures and Devices. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 11, 235-259.
- [81] Thompson, G. E.; Wood, G. C., Anodic Films on Aluminium. In *Treatise on Materials Science and Technology*, J.C. S., Ed. Elsevier, pp 205-329, 1983.
- [82] Han, H.; Park, S.-J.; Jang, J. S.; Ryu, H.; Kim, K. J.; Baik, S.; Lee, W., In Situ Determination of the Pore Opening Point during Wet-Chemical Etching of the Barrier Layer of Porous Anodic Aluminum Oxide: Nonuniform Impurity Distribution in Anodic Oxide. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (8), 3441-3448, 2013.
- [83] Lee, J. N., S.; Nakano, Y.; Kato, S.; Kitazawa, H.; Kido, G., Structural analysis of anodic porous alumina used for resistive random access memory. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11, 2010.
- [84] Le Coz, F.; Arurault, L.; Fontorbes, S.; Vilar, V.; Datas, L.; Winterton, P., Chemical composition and structural changes of porous templates obtained by anodising aluminium in phosphoric acid electrolyte. *Surface and Interface Analysis*, 42 (4), 227-233, 2010.
- [85] Nielsch, K.; Choi, J.; Schwirn, K.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U., Self-ordering Regimes of Porous Alumina: The 10 Porosity Rule. *Nano Letters*, 2 (7), 677-680, 2002.

- [86] Zaraska, L.; Kurowska, E.; Sulka, G.; Senyk, I.; Jaskula, M., The effect of anode surface area on nanoporous oxide formation during anodizing of low purity aluminum (AA1050 alloy). *J Solid State Electrochem*, 18 (2), 361-368, 2014.
- [87] Vojkuvka, L. Development of technology and applications based on porous alumina nanostructures. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, 2009.
- [88] Santos, A.; Balderrama, V. S.; Alba, M.; Formentín, P.; Ferré-Borrull, J.; Pallarès, J.; Marsal, L. F., Nanoporous Anodic Alumina Barcodes: Toward Smart Optical Biosensors. *Advanced Materials*, 24 (8), 1050-1054, 2012.
- [89] Kikuchi, T.; Nishinaga, O.; Natsui, S.; Suzuki, R. O., Fabrication of Anodic Nanoporous Alumina via Acetylenedicarboxylic Acid Anodizing. *ECS Electrochemistry Letters*, 3 (7), C25-C28, 2014.
- [90] Zílio, S. C., *Óptica moderna: fundamentos e aplicações*. Instituto de Física de São Carlos: 2009; p 306.
- [91] Mulligan, J. F., Who were Fabry and Pérot? *American Association of Physics Teachers*, p 6, 1998.
- [92] Born, M. A. X.; Wolf, E., Elements of the theory of interference and interferometers. In *Principles of Optics*, 6^a ed.; Wolf, M. B., Ed. Pergamon, pp 256-369, 1980.
- [93] Kumeria, T.; Losic, D., Controlling interferometric properties of nanoporous anodic aluminium oxide. *Nanoscale Res Lett*, 7 (1), 88-88, 2012.
- [94] Cantelli, L.; Santos, J. S.; Trivinho-Strixino, F., The effect of anodization temperature on optical properties of nanoporous anodic alumina (NAA) films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.
- [95] Pacholski, C.; Sartor, M.; Sailor, M. J.; Cunin, F.; Miskelly, G. M., Biosensing Using Porous Silicon Double-Layer Interferometers: Reflective Interferometric Fourier Transform Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (33), 11636-11645, 2005.
- [96] Macias, G.; Hernández-Eguía, L. P.; Ferré-Borrull, J.; Pallares, J.; Marsal, L. F., Gold-Coated Ordered Nanoporous Anodic Alumina Bilayers for Future Label-Free Interferometric Biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (16), 8093-8098, 2013.
- [97] Sena, M. M. P., R. J.; Frighetto, R. T. S.; Valarini, P. J. , Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, 23 (4), 547 - 556, 2000.
- [98] Ribeiro, F. A. L. B., F. D.; Breikreitz, M. C.; Martins, J. A., Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química. *Jornal do Conselho Regional de Química IV Região 2007*, Ano 16 (85), 14 - 15.

- [99] de Sena, M. M.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T.; Valarini, P., Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, 23 (4), 547, 2000.
- [100] de Souza, A. M.; Poppi, R. J., Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Quim. Nova*, 35 (1), 223-229, 2012.
- [101] Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B., *Chemometrics: a practical guide*. Wiley: 1998.
- [102] Geladi, P.; Kowalski, B. R., Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1-17, 1986.
- [103] Nascimento, D. S. Determinação simultânea de Cu, Pb, Cd, Ni, Co e Zn em etanol combustível por voltametria de redissolução adsortiva e calibração multivariada Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- [104] Pimentel, M. F.; Galvão, R. K. H.; Araújo, M. C. U. d., Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianálito. *Química Nova*, 31, 462-467, 2008.
- [105] Philip-Chandy, R.; Scully, P. J.; Thomas, D., A novel technique for on-line measurement of scaling using a multimode optical fibre sensor for industrial applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 71 (1-2), 19-23, 2000.
- [106] Baldini, F.; Bracci, S., Adsorption-based optical transduction in optical fibre chemical sensors for environmental and industrial applications. In *Studies in Surface Science and Catalysis*, Dąbrowski, A., Ed. Elsevier, pp 925-948, 1999.
- [107] Yan, H. M.; Kraus, G.; Gauglitz, G., Detection of mixtures of organic pollutants in water by polymer film receptors in fibre-optical sensors based on reflectometric interference spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 312 (1), 1-8, 1995.
- [108] Kruss, S.; Hilmer, A. J.; Zhang, J.; Reuel, N. F.; Mu, B.; Strano, M. S., Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (15), 1933-1950, 2013.
- [109] Ding, M.; Brambilla, G., Optical fibres and sensors for biomedical applications. In *Biophotonics for Medical Applications*, Meglinski, I., Ed. Woodhead Publishing, pp 53-78, 2015.
- [110] MacCraith, B. D.; McDonagh, C., Optical Chemical Sensors. In *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Aegerter, M.; Mennig, M., Eds. Springer US, Chapter 41, pp 313-320, 2004.
- [111] Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Mello, L. D.; Kubota, L. T., Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 230-243, 2003.

- [112] Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E., Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8 (3), 1400, 2008.
- [113] Rudolf Seitz, W., Transducer mechanisms for optical biosensors. Part 1: The chemistry of transduction. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 30 (1), 9-19, 1989.
- [114] Lobnik, A. T., M.; Urek, S. K., Optical Chemical Sensors: Design and Applications. In *Advances in Chemical Sensors*, Wang, W., Ed. InTech: 2012; Chapter 1, pp 3-28.
- [115] Lehninger, A. L., *Fundamentos de Bioquímica*. Sarvier: São Paulo, 1977; p 463.
- [116] Junior, W. E. F. F., W. , Proteínas: Hidrólise, Precipitação e um Tema para o Ensino de Química. *Química Nova na Escola* novembro, p 5, 2006.
- [117] Motta, V. T., *Bioquímica Básica*. EDUCS: 2005; p 374
- [118] Pace, C. N.; Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M., Protein Ionizable Groups: pK Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (20), 13285-13289, 2009.
- [119] Wilson, R.; Turner, A. P. F., Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7 (3), 165-185, 1992.
- [120] Leskovac, V.; Trivić, S.; Wohlfahrt, G.; Kandrač, J.; Peričin, D., Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37 (4), 731-750, 2005.
- [121] de Oliveira, R. F.; de Moraes, M. L.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M., Exploiting Cascade Reactions in Bienzyme Layer-by-Layer Films. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 (39), 19136-19140, 2011.
- [122] Gülce, H.; Çelebi, S. S.; Özyörük, H.; Yildiz, A., Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co-immobilized in poly(vinylferrocenium). *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 397 (1-2), 217-223, 1995.
- [123] Pazur, J. H.; Kleppe, K., The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger**. *Biochemistry*, 3 (4), 578-583, 1964.
- [124] Goodsell DS (2006). Glucose oxidase. Molecule of the month: RCSB Protein Data Bank.
- [125] Syshchyk, O.; Skryshevsky, V. A.; Soldatkin, O. O.; Soldatkin, A. P., Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals. *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 89-94, 2015.
- [126] Lu, J.; Drzal, L. T.; Worden, R. M.; Lee, I., Simple Fabrication of a Highly Sensitive Glucose Biosensor Using Enzymes Immobilized in Exfoliated Graphite Nanoplatelets Nafion Membrane. *Chemistry of Materials*, 19 (25), 6240-6246, 2007.

- [127] Delstar Metal Finishing, I., *Electropolishing: a user's guide to applications, quality standards and specifications*. 9^a ed ed.; Houston, 2003.
- [128] Paranzini, A. S. Caracterização superficial do aço inoxidável 316 L eletropolido via técnica eletroquímica de reativação potenciodinâmica. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- [129] Jacquet, P. A., On the Anodic Behavior of Copper in Aqueous Solutions of Orthophosphoric Acid. *Transactions of The Electrochemical Society*, 69 (1), 629-655, 1936.
- [130] Metz, F. I. Electropolishing of metals. Iowa State University Iowa, 1960.
- [131] Franci, P. M. Síntese e formação de filmes nanoestruturados sobre alumina nanoporosa. Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2011.
- [132] Dorico, E. Moldes de alumina para síntese de nanofios eletrodepositados. Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- [133] Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G., *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras - materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. EDIPUCRS: Porto Alegre, 2007; p 60 p.
- [134] Hecht, E., *Optics*. 4^a ed.; Addison-Wesley: São Francisco, p 698.
- [135] Skoog, D. A. W., D. M.; Holler, F. J; Crouch, S. R., *Fundamentos de Química Analítica*. 8^a edição ed.; Cengage Learning: São Paulo, 2010.
- [136] Tsuge, H.; Natsuaki, O.; Ohashi, K., Purification, Properties, and Molecular Features of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biochemistry*, 78 (4), 835-843, 1975.
- [137] Stojadinovic, S.; Vasilic, R., Characterization of Porous Anodic Aluminum Oxide Films by Luminescence Methods - A Review. *Current Nanoscience*, 11 (5), 547-559, 2015.
- [138] Silva, H. d. S. e. Estudo da adsorção de polieletrólitos e do ordenamento molecular de filmes poliméricos automontados através da óptica não-linear. Doutorado em Ciência - área de concentração: física aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- [139] Petri, L.; Ferreira, M.; Moraes, M. L., Toward preserving the structure of the antigenic peptide p17-1 from the HIV-1 p17 protein in nanostructured films. *J Nanosci Nanotechnol.*, 11, 2011.
- [140] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O., Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22, 724-731, 1999.
- [141] Figueiredo Filho, D. B.; Silva Junior, J. A., Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje*, 18 (1), 2010.

- [142] Montero-Moreno, J. M.; Sarret, M.; Müller, C., Self-ordered porous alumina by two-step anodizing at constant current: Behaviour and evolution of the structure. *Microporous and Mesoporous Materials*, 136 (1–3), 68-74, 2010.
- [143] Wu, C.; Sun, H.; Li, Y.; Liu, X.; Du, X.; Wang, X.; Xu, P., Biosensor based on glucose oxidase-nanoporous gold co-catalysis for glucose detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 66 (0), 350-355, 2015.
- [144] Lazzara, T. D.; Lau, K. H. A.; Knoll, W.; Janshoff, A.; Steinem, C., Macromolecular shape and interactions in layer-by-layer assemblies within cylindrical nanopores. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 3, 475-484, 2012.
- [145] Scognamiglio, V., Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. *Biosensors and Bioelectronics*, 47 (0), 12-25, 2013.